



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**Avaliação do Papel dos Neutrófilos na Infecção
Experimental por *Leishmania braziliensis***

FERNANDA OLIVEIRA NOVAIS

Salvador-Bahia-Brasil
2006

61:577.2



004175

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**Avaliação do Papel dos Neutrófilos na Infecção
Experimental por *Leishmania braziliensis***

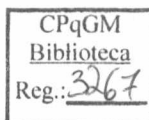
FERNANDA OLIVEIRA NOVAIS

Orientadora: Camila Indiani de Oliveira

**Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental**

Salvador-Bahia-Brasil

2006



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

Novais, Fernanda Oliveira

N935a Avaliação do papel dos neutrófilos na infecção experimental por *Leishmania braziliensis* [manuscrito] / Fernanda Oliveira Novais. - 2007.

70 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2007.

Orientadora: Prof. Dr. Dra. Camila Indiani de Oliveira, Laboratório de Imunoparasitologia.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Neutrófilos. 3. Leishmaniose Americana. 4. Balb/c. I.Título.

CDU 616.993.161:577.2

616.993.161:577.2
N935a

PHL
NFU 2267
004175

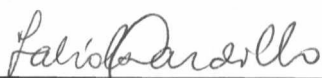
L1LDB1



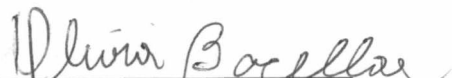
**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL
POR LEISHMANA BRAZILIENSIS**

FERNANDA OLIVEIRA NOVAIS

**FOLHA DE APROVAÇÃO
COMISSÃO EXAMINADORA**



Dra. Fabíola Cardillo
Pesquisadora Adjunta
CPqGM-FIOCRUZ-BA



Dra. Mª Olívia Bacellar
Pesquisadora
UFBA



Dra. Camila Indiani de Oliveira
Tecnologista
CPqGM-FIOCRUZ-BA

AGRADECIMENTOS

- À Dra. Camila Indiani de Oliveira pela orientação e pela paciência nos momentos difíceis;
- À Dra. Cláudia Brodskyn e a Dra. Valéria Borges pelas sugestões enriquecedoras;
- À Dra. Aldina Barral e Dr. Manoel Barral-Netto pela acolhida dentro e fora do laboratório e pela inspiração diária;
- Ao Dr. George dos Reis e a Dra. Flávia Ribeiro-Gomes e todos do laboratório de Biologia Imunitária pelos ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho;

Dei muito trabalho a vocês: Jorge Clarêncio, Tatiana de Moura, Juqueline Cristal, Sarah Falcão e Rômulo Santiago. Não conseguiria sem essas pessoas queridas!

Não posso deixar de agradecer imensamente a todos do LIP e LIM1, amigos importantes que me fazem crescer diariamente. Um MUITO OBRIGADA especial a Elze Leite, que é mais que uma secretária super eficiente!

- À minha família pelo amor e pela torcida;

Algumas pessoas me ajudaram indiretamente nesse percurso, com muito amor, carinho e momentos de descontração. Vocês fazem a minha vida mais bonita e interessante: Toluca, Júlia, Zeca, Luna, Raone e Cristiano.

- Aos funcionários do CPqGM;
- Aos professores e secretárias da pós-graduação em Patologia;
- Às agencias financiadoras: CNPq e FAPESB.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
SUMÁRIO.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 A LEISHMANIOSE.....	12
1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	15
1.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS NEUTRÓFILOS.....	17
1.4 O PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NA LEISHMANIOSE.....	20
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVO GERAL.....	25
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
4.1 EXPERIMENTOS IN VITRO.....	26
4.2 EXPERIMENTOS IN VIVO.....	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
5.1 PARASITAS E CAMUNDONGOS.....	29
5.2 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES.....	29
5.3 INFEÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	30
5.4 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS E INDUÇÃO DE APOPTOSE E MORTE.....	30
5.5 CULTURA DE CÉLULAS JURKAT.....	31
5.6 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE INFECCÃO.....	31
5.7 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	32
5.8 CARACTERIZAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS.....	33
5.9 CO-INOCULAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E <i>L. BRAZILIENSIS</i>	33
5.10 DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS.....	33
5.11 CARGA PARASITÁRIA.....	34
5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
6 RESULTADOS.....	35
6.1 PURIFICAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PERITONIAIS.....	35
6.2 INDUÇÃO DE APOPTOSE E MORTE DE NEUTRÓFILOS PERITONIAIS.....	36
6.3 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	45
6.4 CARACTERIZAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS RECRUTADOS POR <i>L. BRAZILIENSIS</i>	46
6.4. EFEITO DA CO-INOCULAÇÃO DE NEUTRÓFILOS VIVOS NA INFECCÃO POR <i>L. BRAZILIENSIS IN VIVO</i>	48
6.5. EFEITO DA DEPLEÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i>	50
7 DISCUSSÃO.....	53
8 CONCLUSÕES.....	61
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

- CBA – *Cytometric Bead Array*
- CCL – *C-C chemokine ligand*
- FITC – Isotiocianato de Fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate*)
- HE – Hematoxilina & Eosina
- IFN - γ – Interferon - gama
- IgG – Imunoglobulina G
- IL-4 – Interleucina - 4
- IL-10 – Interleucina - 10
- IL-12 – Interleucina - 12
- Lb – *Leishmania braziliensis*
- LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
- LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada
- LCM – Leishmaniose Cutâneo Mucosa
- LT – Leishmaniose Tegumentar
- LV – Leishmaniose Visceral
- MFI – Média de Intensidade de Fluorescência
- MIP-1 β – *Macrophage inflammatory protein - 1 beta*
- MPO – mieloperoxidase
- NADP – *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
- NE – Elastase Neutrófila (*neutrophilic elastase*)
- PGE₂ – Prostaglandina E₂
- PI – Iodeto de Propídeo
- PMN – Leucócitos Polimorfonucleares

- PS – Fosfatidilserina (*Phosphatidilserine*)
- RNA m – RNA mensageiro
- ROS – espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)
- TGF- β – Fator de Crescimento Transformante - beta (*Transforming Growth Factor - beta*)
- Th – T auxiliadora (*T helper*)
- TNF- α – Fator de Necrose Tumoral - alfa (*Tumoral Necrosis Factor - alpha*)
- UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

Figura 2. Pureza de neutrófilos obtidos após a injeção de tioglicolato.

Figura 3. Indução de apoptose e morte de neutrófilos peritoniais.

Figura 4. Neutrófilos vivos reduzem a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. braziliensis*.

Figura 5. Neutrófilos mortos não reduzem a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. braziliensis*.

Figura 6. Neutrófilos vivos de camundongos C57BL/6 reduzem a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. braziliensis*.

Figura 7. Células Jurkat vivas não alteram a infecção de macrófagos com *L. braziliensis*.

Figura 8. Caracterização de neutrófilos recrutados por *L. braziliensis* e tioglicolato.

Figura 9. A co-inoculação de neutrófilos vivos e *L. braziliensis* em camundongos BALB/c diminui o tamanho da lesão.

Figura 10. A co-inoculação de *L. braziliensis* e neutrófilos vivos leva a uma diminuição na carga parasitária em camundongos BALB/c.

Figure 11. A depleção de neutrófilos exacerba a lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*.

Figura 12. A depleção de neutrófilos leva a um aumento na carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Produção de TNF- α em macrófagos infectados em contato com neutrófilos vivos, apoptóticos e mortos.

RESUMO

AValiação DO PAPEL DOS NEutrÓFILOS NA INFEcção EXPERIMENTAL POR *LEISHMANA BRAZILIENSIS*. FERNANDA OLIVEIRA NOVAIS. Neutrófilos são componentes importantes do sistema imune e fazem parte da primeira linha de defesa contra infecções. Na infecção intradérmica com *L. braziliensis* demonstramos que os neutrófilos são constantemente recrutados ao sítio de infecção. Além disso, já foi demonstrado que a interação de neutrófilos com macrófagos regula a resposta contra *L. major*. Neste estudo, investigamos o papel dos neutrófilos na infecção causada por *Leishmania braziliensis* usando o modelo de infecção intradérmica. Neutrófilos foram purificados de camundongos BALB/c, após a injeção intraperitoneal de tioglicolato, sua pureza foi avaliada pela marcação com Gr-1, utilizando a citometria de fluxo. A posterior co-cultura de neutrófilos vivos ou mortos pelo calor com macrófagos peritoniais infectados com *L. braziliensis* levou a uma redução significativa na taxa de infecção e no número de amastigotas por célula quando comparado com as culturas controle. A presença de neutrófilos vivo ou mortos na cultura de macrófagos infectados com *L. braziliensis* foi associada a produção de altos níveis de TNF- α . Para avaliar o papel dos neutrófilos *in vivo*, camundongos foram co-inoculados com neutrófilos vivos e *L. braziliensis*. Observou-se que estes animais desenvolveram lesões significativamente menores e apresentaram um número menor de parasitas quando comparados com os camundongos controle. Por último, camundongos BALB/c foram depletados de neutrófilos após injeção intraperitoneal do anticorpo RB6-8C5 e foram, em seguida, infectados com *L. braziliensis*. Camundongos depletados apresentaram lesões e carga parasitária maiores quando comparados com camundongos controle, os quais receberam injeção de IgG de rato. Estes dados indicam que os neutrófilos são células fundamentais para a eliminação inicial de *L. braziliensis* em camundongos BALB/c. [PALAVRAS CHAVE] *Leishmania braziliensis*, neutrófilos, BALB/c, Leishmaniose Tegumentar Americana.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ROLE OF NEUTROPHILS IN AN EXPERIMENTAL MODELO OF INFECTION EMPLOYING *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*. **FERNANDA OLIVEIRA NOVAIS**. Neutrophils are important components of the immune system and provide the first mechanism of defense against infection. In the dermal experimental model of infection with *L. braziliensis*, we observed that neutrophils are constantly recruited to the lesion site, throughout the infection period. Moreover, it was observed that the interaction between macrophages and neutrophils regulates infection with *L. major*. In the present work we investigated the role of neutrophils in the infection caused by *Leishmania braziliensis* using a mouse intradermal model of infection. Neutrophils were obtained from mouse peritoneal cavities by injection of thioglycolate broth, purity was assessed by flow cytometry using Gr-1 staining. Live and heat-killed neutrophils incubation with *L. braziliensis* infected peritoneal macrophages from BALB/c mice led to a significant decrease in the infection rate as well as in the number of amastigotes per cell when compared to cells infected with promastigotes only. Co-incubation of live or heat-killed neutrophils with macrophages infected with *L. braziliensis* was associated with the production of high levels of TNF- α . To investigate the role of neutrophils in the *in vivo* infection, BALB/c mice were co-inoculated with *L. braziliensis* and neutrophils. In these experiments, we observed that co-inoculation of live neutrophils and *L. braziliensis* in the ear dermis led to the development of smaller lesions as well as a decrease in parasite load. On the contrary, when mice were depleted of neutrophils by injection of RB6-8C5 antibody, we observed that depleted animals showed an increase in lesion size and in parasite load when compared to animals injected with control rat IgG antibody. According to our data, neutrophils are essential in the initial elimination of *L. braziliensis* in BALB/c mice. [KEYWORDS] *Leishmania braziliensis*, neutrophils, American Tegumentary Leishmaniasis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A leishmaniose

A leishmaniose é constituída por um grupo de doenças causadas pela infecção por parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae), que são injetados na derme do hospedeiro pela picada do flebótomo infectado. Existem cerca de 500 espécies de flebótomos identificados, contudo, apenas 30 deles estão implicados como vetores da doença (WHO, 2000).

No Brasil, os flebotomíneos responsáveis pela transmissão da *Leishmania* são pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (Ordem Diptera, Família Psychodidae). A transmissão da *Leishmania* dá-se durante o repasto sangüíneo do flebótomo fêmea (Fig. 1). Durante o processo de alimentação, até 1.000 formas infectantes da *Leishmania* são introduzidas no local da picada junto com a saliva do inseto. Dentro de 4 a 6 horas, estes parasitas são interiorizados pelos macrófagos teciduais e são envoltos por um vacúolo fagocítico. Rapidamente, as formas promastigotas perdem o flagelo e se transformam nas formas amastigotas, que são capazes de sobreviver dentro do vacúolo parasitóforo, no interior do macrófago. No vacúolo parasitóforo, as formas amastigotas se multiplicam por divisão binária, resistindo aos mecanismos efetores da resposta imune do hospedeiro. Eventualmente, os macrófagos infectados se rompem, liberando novas amastigotas, as quais podem invadir novas células, re-iniciando o ciclo de vida no interior do hospedeiro vertebrado.

Somente as fêmeas de flebótomos são capazes de transmitir a *Leishmania*, adquirindo-a através da alimentação sangüínea no hospedeiro vertebrado (seres humanos ou outros mamíferos infectados com o parasita). Uma vez no interior do flebótomo, as amastigotas se diferenciam em promastigotas e se deslocam para a

porção anterior do intestino do vetor. Após a migração para a faringe do inseto, as formas promastigotas diferenciam-se nas formas infectantes, chamadas de promastigotas metacíclicas.

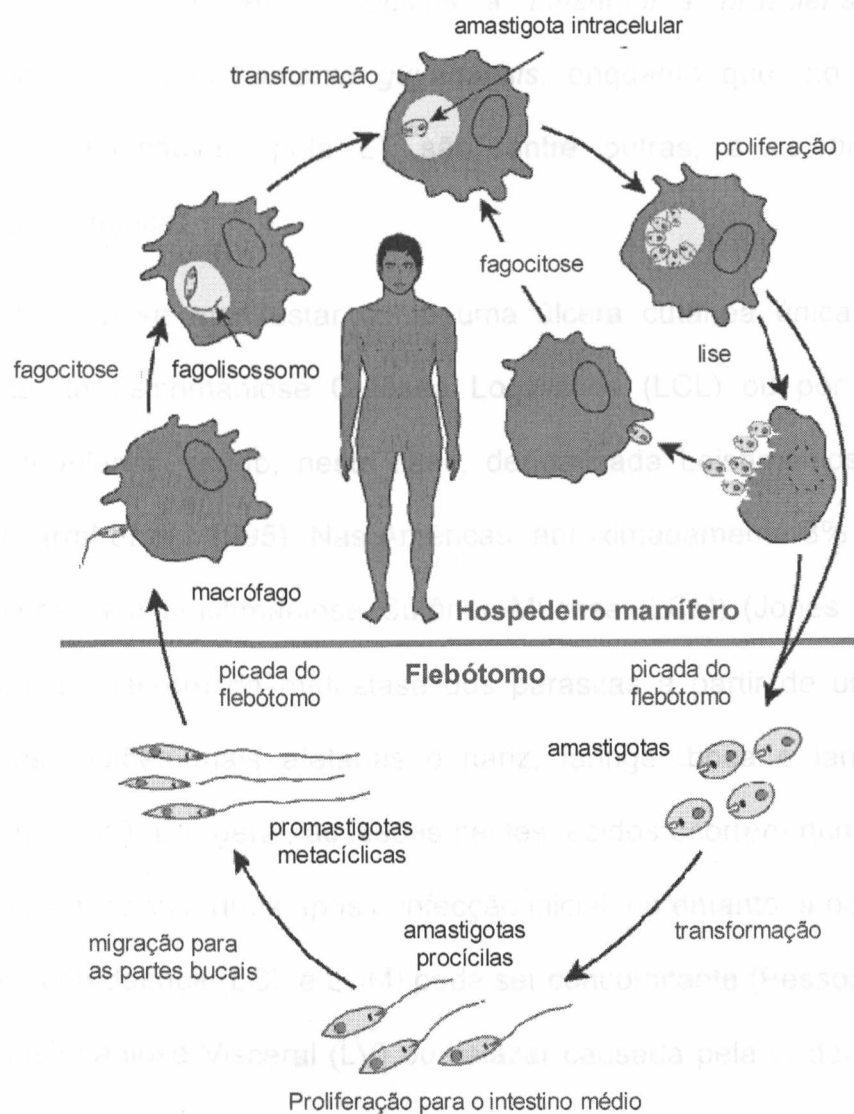


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (modificado de www.wehi.edu.au).

A leishmaniose apresenta duas formas clínicas principais, a forma cutânea ou tegumentar e a forma visceral. A Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar (LT) é caracterizada pela formação de úlceras na pele em locais expostos como rosto, pernas e braços. Esta úlcera apresenta, caracteristicamente, bordas elevadas e um

fundo necrótico. Embora a LT comprometa primariamente a pele, a linfadenopatia regional é comum, podendo preceder o aparecimento das lesões cutâneas (Barral *et al.*, 1995). Nas Américas, a LT é causada por uma variedade de espécies sendo seus principais agentes etiológicos a *Leishmania braziliensis*, a *Leishmania amazonensis* e a *Leishmania guyanensis*, enquanto que, no Velho Mundo, as espécies responsáveis pela LT são, entre outras, a *Leishmania major* e a *Leishmania tropica*.

A LT pode se manifestar como uma úlcera cutânea única e, neste caso, é chamada de Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) ou por meio de diversas lesões nodulares, sendo, neste caso, denominada Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) (Barral *et al.*, 1995). Nas Américas, aproximadamente 3% dos pacientes são acometidos pela Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM) (Jones *et al.*, 1987). Esta complicação decorre da metástase dos parasitas a partir de uma lesão cutânea, sendo as regiões mais afetadas o nariz, faringe, boca e laringe (revisado em Marsden, 1986). Em geral, as lesões nestes tecidos ocorrem num período que pode variar de semanas a anos após a infecção inicial, no entanto, a ocorrência de ambas as formas da doença (LCL e LCM) pode ser concomitante (Pessoa & Barreto, 1944).

A Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar causada pela *L. donovani* e *L. chagasi* resulta da incapacidade do sistema imune de ativar macrófagos, o que leva a disseminação hematogênica do parasita. Isto leva ao desenvolvimento de uma enfermidade infecciosa crônica capaz de causar um estado de debilidade progressivo, que pode levar ao óbito se não for submetida a um tratamento específico.

Nos últimos dez anos, as regiões endêmicas para as leishmanioses têm se alastrado e existe um aumento importante no número de casos da doença.

Atualmente, 88 países são afetados pelas leishmanioses e existe um número substancial de casos não reportados. Estima-se que 350 milhões de indivíduos vivem em área de risco, 12 milhões de pessoas se encontram infectadas com o parasita e outros 2 milhões de novos casos surgem anualmente (WHO, 2000).

1.2 Modelos experimentais de Leishmaniose Tegumentar

Inicialmente, observou-se que a inoculação de *Leishmania major* em camundongos de diferentes cepas resulta em dois padrões distintos de doença. O padrão de resistência, por exemplo, é o observado em camundongos C57BL/6. Neste modelo, os animais desenvolvem uma lesão que cura espontaneamente e esta cura está associada ao desenvolvimento de uma resposta imune celular do tipo T *helper* 1 (ou Th1), caracterizada pela presença de altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-4. Em contraste, camundongos BALB/c são suscetíveis à infecção por *L. major*, pois desenvolvem uma resposta imune celular do tipo Th2, com baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-4 (revisado em Locksley & Scott, 1991). Nos camundongos BALB/c não há cura espontânea da lesão e este modelo está associado às formas clínicas da doença como a LV e a LCD (revisado em Sacks & Noben-Trauth, 2002), nos quais também não se observa cura espontânea no homem. Tradicionalmente, estes modelos experimentais de infecção são desenvolvidos a partir da inoculação de altas quantidades do parasita (por volta de 10^7 promastigotas) na pata do animal, por via subcutânea. Mais recentemente, Belkaid *et al.* (1998) desenvolveram um modelo experimental que mimetiza melhor a infecção natural. Neste modelo, o inóculo de baixas doses de *L. major* (100 a 1000 promastigotas), na derme da orelha de camundongos BALB/c, associado à presença de saliva do flebotomíneo *Phlebotomus papatasi*, levou ao desenvolvimento de uma

lesão mais acentuada quando comparado aos controles inoculados apenas com *L. major*. Mesmo em camundongos C57BL/6, considerados resistentes à infecção por *L. major*, houve ulceração e necrose tecidual. Desde então, trabalhos na literatura vêm mostrando a utilidade deste modelo de infecção intradérmica, considerado mais similar ao que ocorre na natureza, no estudo dos aspectos da patogênese da LT (Belkaid *et al.*, 2002a; Belkaid *et al.*, 2002b; Courret *et al.*, 2003; Tabbara *et al.*, 2005; Bisti *et al.*, 2006).

Embora a doença causada por *L. braziliensis* seja um sério problema de saúde pública no Brasil e na América do Sul, existem poucos trabalhos experimentais que caracterizam a resposta imune a este parasita. Isto se deve, provavelmente, ao fato de que as linhagens de camundongos atualmente disponíveis são pouco suscetíveis a este parasita. Neal & Hale (1983) testaram a base da cauda de camundongos BALB/c como sítio de infecção, utilizando 2×10^7 parasitas. Os autores conseguiram observar o desenvolvimento de pequenos nódulos, o que sugeriu uma baixa sobrevivência e multiplicação do parasita neste hospedeiro. Childs *et al.* (1984) testaram a infecção com *L. braziliensis* em oito linhagens de camundongos, utilizando o focinho destes animais como local de inóculo, e observaram a cura da infecção em todas as cepas de camundongos usadas. Mais tarde, Donnelly *et al.* (1998) testaram a infecção de camundongos BALB/c com um inóculo de 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* na pata do animal. Os autores observaram o desenvolvimento de lesão nodular, mas não houve formação de uma úlcera. Em contraste, a mesma linhagem de camundongos foi infectada com 10^6 promastigotas de *L. major* e apresentou uma lesão que surgiu mais rapidamente e que se tornou ulcerada e necrótica no 21º dia após a infecção. Neste mesmo trabalho, os autores dosaram a quantidade de citocinas produzidas pelos animais infectados e

concluíram que camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* apresentam baixos níveis de IL-4 e altos níveis de IFN- γ , quando comparados com camundongos infectados com *L. major*. Esta resposta foi então associada com a eliminação do parasita e com a conseqüente resistência à infecção (DeKrey *et al.*, 1998).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um novo modelo experimental para o estudo da infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c (de Moura *et al.*, 2005). Este modelo utiliza a via intradérmica de inoculação do parasita, assemelhando-se à infecção natural. Foi observado que a infecção de 10^5 *L. braziliensis*, na derme da orelha, leva ao surgimento de uma lesão ulcerada, com bordas elevadas e fundo necrótico, que cura espontaneamente, cerca de 10 semanas após o início da infecção. Os camundongos infectados desta maneira apresentaram altos níveis de IFN- γ , produzido tanto por células T CD4⁺ quanto por células T CD8⁺, presentes no linfonodo de drenagem destes animais. Além disso, a avaliação histopatológica da orelha dos camundongos infectados mostrou um recrutamento contínuo de polimorfonucleares para o sítio de infecção. Estes achados apontaram para a hipótese de que os neutrófilos poderiam desempenhar um papel na cura da infecção.

1.3 Características gerais dos neutrófilos

Neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares (PMN) extremamente abundantes e que, em condições normais, estão restritos ao sangue. Uma vez que a homeostase é quebrada nos tecidos periféricos, os neutrófilos são os primeiros tipos celulares a serem recrutados ao tecido alterado. Os neutrófilos são caracterizados pela presença de um núcleo multilobulado, de um citoplasma granular e são capazes de fagocitar e destruir microrganismos usando uma combinação de mecanismos oxidativos e não-oxidativos (revisado em Pham, 2006). Após a fagocitose pelos

neutrófilos, os microrganismos invasores passam para um compartimento especializado chamado de fagolisossomo. O processo de fagocitose ativa o sistema NADPH oxidase que é capaz de induzir a produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), as quais são responsáveis pela destruição direta dos microrganismos (mecanismo oxidativo) (revisado em Roos *et al.*, 2003). A fagocitose de microrganismos também induz a fusão do fagolisossomo com grânulos específicos dos neutrófilos que, nestas condições, liberam peptídeos e proteases os quais podem levar à morte do patógeno (mecanismo não-oxidativo) (revisado em Pham, 2006). Desta ação microbicida participam pelo menos quatro subtipos de grânulos, os quais servem como mecanismos efetores para a destruição de patógenos fagocitados. Estes grânulos também atuam como importantes mediadores inflamatórios quando liberados na matriz extracelular (revisado em Faurschou & Borregaard, 2003).

Os grânulos azurofílicos ou primários contêm diversas enzimas sintetizadas como pró-formas que são clivadas e estocadas em suas formas ativas no interior dos grânulos. Entre elas destaca-se a mieloperoxidase (MPO) que reage com o H_2O_2 , formado pela NADPH oxidase, e aumenta o potencial tóxico deste antioxidante (revisado em Faurschou & Borregaard, 2003). Estão presentes também as alfa-defensinas, que são os constituintes mais abundantes destes grânulos. A atividade microbicida das alfa-defensinas é atribuída à sua capacidade de formar poros trans-membrana e à sua capacidade de atrair células dendríticas imaturas e linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ (Yang *et al.*, 2000). Os grânulos primários contêm também as serina proteases como a catepsina-G, proteinase 3 e a elastase neutrofílica (NE, do inglês *neutrophilic elastase*). Estas proteases têm papel importante na atividade proteolítica contra uma variedade de componentes da matriz extracelular, como as

fibronectinas, lamininas e colágenos do tipo IV. Além disso, contribuem para a ativação do endotélio, de células epiteliais, macrófagos, linfócitos, plaquetas e apresentam atividade microbicida (revisado em Faurschou & Borregaard, 2003).

Os grânulos específicos ou secundários participam principalmente das atividades antimicrobianas dos neutrófilos através da mobilização de seu conteúdo para o fagolisossomo ou para o ambiente extracelular. Por outro lado, os grânulos gelatinosos ou terciários são importantes como reservatórios de enzimas de degradação da matriz extracelular e de receptores de membranas importantes durante o extravasamento de neutrófilos e a diapedese. Além desses três subtipos de grânulos, os neutrófilos possuem as chamadas “vesículas secretoras” que constituem um reservatório de receptores associados à membrana, necessários nas fases iniciais da resposta inflamatória mediada por neutrófilos (revisado em Segal, 2005).

Os neutrófilos têm origem na medula óssea a partir de células tronco mielóides e são lançados na circulação onde apresentam um curto ciclo de vida (8-20 horas). Se um neutrófilo circulante não for recrutado para um local de inflamação dentro deste período, ele sofre morte celular programada e é normalmente fagocitado por macrófagos. A morte celular programada ou apoptose é um mecanismo fundamental tanto para o desenvolvimento normal de um organismo bem como para o controle da resposta imune. A condensação do núcleo e a clivagem da cromatina são aspectos característicos de uma célula em apoptose. Nos momentos iniciais desse processo de morte celular, também ocorrem mudanças na expressão de moléculas de superfície na bicamada lipídica. Há perda da assimetria dos fosfolípidios com translocação da fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidylserine*) da monocamada interna para a externa (revisado em Krysko *et al.*, 2006).

Em 2004, Tsuda e colaboradores, sugeriram a existência de dois subtipos de neutrófilos: PMN I e PMN II, os quais podem ser caracterizados quanto às diferenças na produção de quimiocinas, citocinas e expressão de receptores do tipo Toll. Estes diferentes subtipos de neutrófilos estariam envolvidos numa ativação dos macrófagos de maneira diferenciada. Neutrófilos do tipo I seriam capazes de ativar macrófagos, levando a uma conseqüente destruição do *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), enquanto neutrófilos do tipo II desativam macrófagos, tornando estas células suscetíveis à infecção por MRSA.

Como dito anteriormente, os neutrófilos estão presentes principalmente em tecidos inflamados, nos quais a sua eliminação é um pré-requisito para a resolução da resposta inflamatória. Este mecanismo é dependente da fagocitose mediada por outras células, em especial os macrófagos (revisado em Serhan & Savill, 2005). A depender do contexto, a remoção de células apoptóticas por fagócitos pode suprimir a inflamação por meio da liberação de TGF- β 1, uma citocina anti-inflamatória, e por meio da inibição da secreção de mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos, como o TNF- α , regulando assim a resposta imune (revisado em Savill & Fadok, 2000).

1.4 O papel dos neutrófilos na leishmaniose

Apesar de ser bem caracterizado o papel dos neutrófilos na infecção por algumas bactérias extracelulares (revisado em Hampton *et al.*, 1998) o seu papel na resposta a patógenos intracelulares, como a *Leishmania*, por exemplo, é pouco conhecido. Inicialmente, Pearson & Steigbigel (1981), demonstraram a capacidade de polimorfonucleares humanos de fagocitar e destruir *L. donovani*, parasita causador da LV, através de um mecanismo dependente de H₂O₂. Mais tarde, observou-se que

existe uma diferença no recrutamento de neutrófilos em camundongos suscetíveis e em camundongos resistentes infectados com *L. major* (Beil *et al.*, 1992). Camundongos suscetíveis (BALB/c) recrutaram principalmente neutrófilos ao sítio de infecção, entre 6 horas e 12 dias após a infecção. Nos animais resistentes (C57BL/6), apesar de um grande influxo de neutrófilos no início da infecção, também foram recrutadas células mononucleares em grande número. Ensaios de depleção de neutrófilos realizados em camundongos infectados com *L. major* mostraram que, tanto em camundongos das linhagens BALB/c quanto C57BL/6, a chegada de parasitas no linfonodo é mais rápida na ausência de neutrófilos. Isto leva a um aumento no tamanho da lesão e na carga parasitária após a infecção em ambas as linhagens de camundongo (Lima *et al.*, 1998). Um outro trabalho se propôs a avaliar o efeito da depleção de neutrófilos na produção de citocinas em camundongos resistentes ou suscetíveis à infecção por *L. major* (Chen *et al.*, 2005). Os autores mostram que os neutrófilos de camundongos C3H/HeJ (modelo de resistência à *L. major*), mas não os de BALB/c, produzem RNAm para citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- γ e TNF- α . Ainda neste trabalho, os autores demonstraram que a depleção de neutrófilos em camundongos resistentes reduziu a quantidade de RNAm para IFN- γ e TNF- α em macrófagos peritoniais. No entanto, a depleção de neutrófilos não alterou o tamanho da lesão destes animais. Nos camundongos suscetíveis (BALB/c), depletados de neutrófilos há um aumento na produção de IL-4 no linfonodo associado a um aumento na carga parasitária e no tamanho da lesão. Estes resultados sugerem que certo nível de resistência à infecção por *L. major* é dependente de neutrófilos em camundongos BALB/c, o que não ocorre em camundongos C3H/HeJ. Por outro lado, Tacchini-Cottier e colaboradores (2000) demonstraram uma associação dos polimorfonucleares com o desenvolvimento de

uma resposta do tipo T *helper* 2 em camundongos suscetíveis a infecção por *L. major*. Neste trabalho, os autores observaram que a depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c impede uma produção exacerbada de IL-4 logo nas primeiras horas após a infecção e isso se reflete no menor tamanho da lesão desses animais. Os dados existentes até o momento mostram que existe uma divergência quanto ao papel dos neutrófilos na infecção por *L. major* no modelo murino.

Em um modelo murino de leishmaniose visceral foi demonstrado, por microscopia eletrônica, que há envolvimento de neutrófilos no baço, mas não no fígado de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* (Rousseau *et al.*, 2001). Além disso, os autores mostram que os neutrófilos contribuem para a destruição parasitária no início da infecção, contudo não são importantes na fase crônica da doença neste modelo experimental. Estudos *in vitro* têm demonstrado que diversos fatores são responsáveis pela sobrevivência ou morte do parasita fagocitado por neutrófilos. Laufs e colaboradores (2002) demonstraram que a fagocitose de *L. major* mediada por opsonina induz a ativação dos neutrófilos, levando a eliminação do parasita. Na ausência deste mecanismo, o parasita escapa da morte e permanece intacto dentro do neutrófilo. Este mesmo grupo de pesquisadores sugere que a infecção de neutrófilos por *Leishmania* é capaz de retardar a apoptose nos mesmos e que a fagocitose de PMN infectados por macrófagos seria um meio silencioso de entrada do parasita nos macrófagos, o seu principal alvo no hospedeiro vertebrado (van Zandbergen *et al.*, 2004). Contudo, não sabemos se esta teoria se aplicaria a todas as espécies de *Leishmania*.

Mais recentemente, foi demonstrado que os neutrófilos têm um papel deletério na infecção por *L. major* em camundongos suscetíveis (BALB/c), entretanto, são importantes na resistência de camundongos C57BL/6 (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004).

Este trabalho demonstrou, por meio de experimentos *in vitro*, que a presença de neutrófilos mortos pelo calor aumenta a taxa de infecção de macrófagos inflamatórios de camundongos BALB/c por *L. major*. O efeito inverso foi observado quando se utilizou células dos camundongos C57BL/6, onde se observou que a presença de neutrófilos é importante na eliminação do parasita. Observou-se também que o crescimento exacerbado de *L. major* nos macrófagos de camundongos BALB/c foi dependente da produção de PGE₂ e TGF-β, enquanto que a eliminação dos parasitas nos macrófagos de camundongos C57BL/6 foi decorrente da produção de elastase neutrofílica e TNF-α. *In vivo*, os autores demonstraram que a depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c reduz a carga parasitária nestes animais, enquanto que, em camundongos C57BL/6, a ausência de neutrófilos leva ao aumento do número de parasitas no linfonodo.

Como descrito acima, a maioria dos estudos acerca do papel dos neutrófilos na infecção por *Leishmania* foi feita empregando-se o modelo experimental de infecção por *L. major*. No entanto, sabe-se que esta infecção é bastante diferente daquela causada por *L. braziliensis* (revisado em de Oliveira & Barral-Netto, 2005). Além disso, nenhum destes estudos empregou o modelo de infecção intra-dérmica. Diante dos achados acerca da presença de neutrófilos na infecção intra-dérmica por *L. braziliensis* (de Moura *et al.*, 2005) e diante das diferenças entre o curso da infecção por *L. major* e *L. braziliensis*, resolvemos avaliar qual o papel dos neutrófilos na infecção por *L. braziliensis*, utilizando a orelha como sítio de inoculação.

2 JUSTIFICATIVA

Em virtude da importância da *L. braziliensis*, no que diz respeito à LT no estado da Bahia e no nordeste como um todo (onde foram registrados, no ano de 2000, em torno de 30% dos casos de LT do Brasil – fonte: FUNASA) e em virtude dos questionamentos levantados sobre o papel dos polimorfonucleares no modelo de infecção recentemente desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, acreditamos que se torna extremamente interessante investigar o papel dos neutrófilos e a sua interação com macrófagos na infecção pela *L. braziliensis*. A nossa hipótese é de que a presença de neutrófilos é importante no controle parasitário na infecção causada por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel dos polimorfonucleares no curso da infecção por *L. braziliensis* em ensaios de infecção *in vitro* e *in vivo* em camundongos BALB/c.

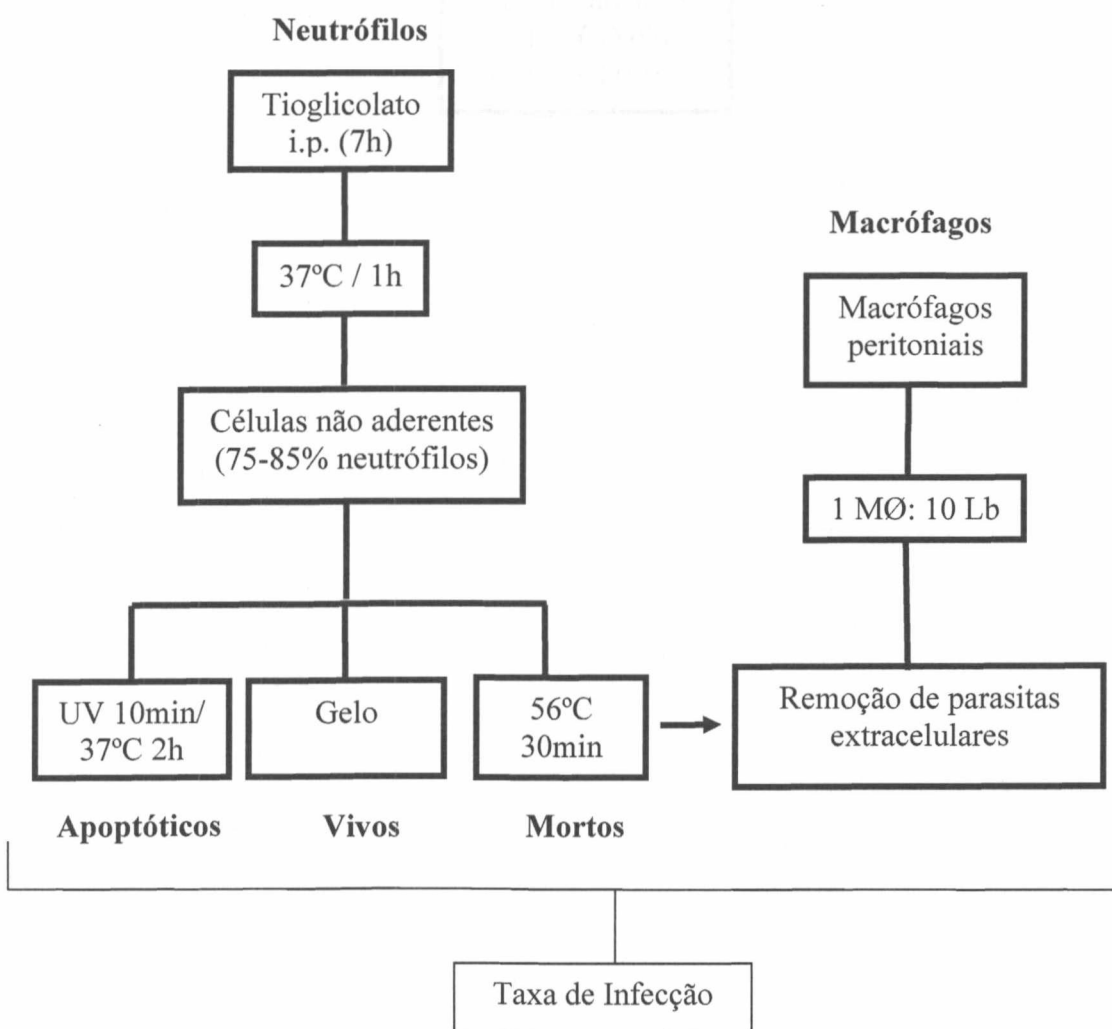
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o papel da fagocitose de neutrófilos por macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* in vitro.
- Avaliar o desenvolvimento da lesão em animais co-inoculados com *L. braziliensis* e neutrófilos vivos em camundongos BALB/c.
- Avaliar o efeito da depleção de neutrófilos na infecção *in vivo* por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c.

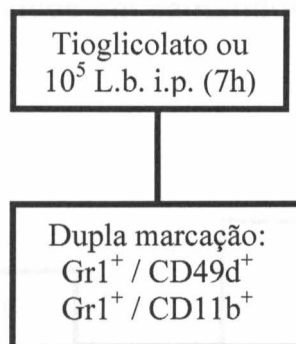
4 DESENHO EXPERIMENTAL

4.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*:

1) Avaliar o papel da fagocitose de neutrófilos por macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* in vitro.

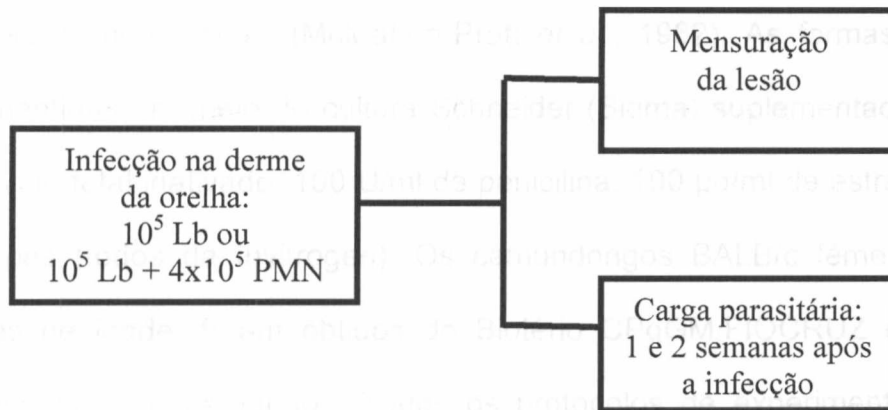


2) Caracterizar os neutrófilos recrutados por tioglicolato ou *L. braziliensis*.

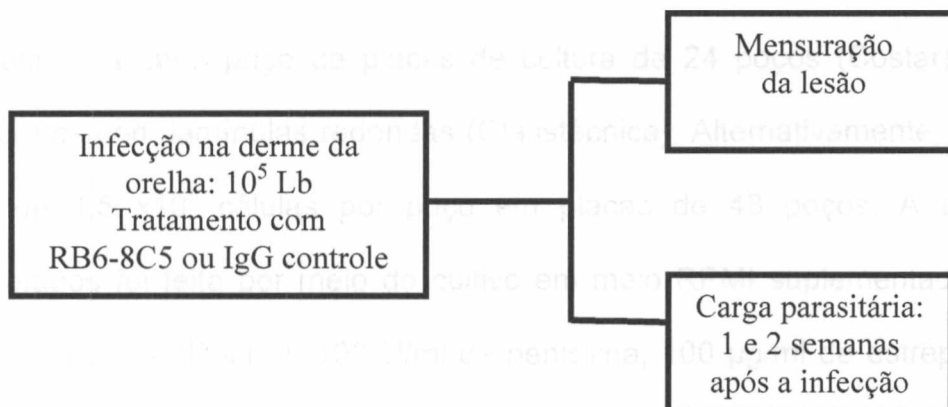


4.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

1) Avaliar o desenvolvimento da lesão em animais co-inoculados com *L. braziliensis* e neutrófilos vivos em camundongos BALB/c.



2) Avaliar o efeito da depleção de neutrófilos na infecção *in vivo* por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c.



5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Parasitas e camundongos

A cepa de *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) utilizada neste estudo foi obtida de um paciente com LT e sua caracterização foi feita por PCR (Castilho *et al.*, 2003) e anticorpos monoclonais (McMahon-Pratt *et al.*, 1982). As formas promastigotas foram mantidas em meio de cultura Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 20 mM HEPES (todos da Invitrogen). Os camundongos BALB/c fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, foram obtidos do Biotério CPqGM/FIOCRUZ e mantidos em condições livre de patógenos. Todos os protocolos de experimentação utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM/FIOCRUZ.

5.2 Obtenção de macrófagos residentes

Os macrófagos residentes foram obtidos após lavagem do peritônio dos camundongos com 5 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen), utilizando-se uma agulha 22 G. As células obtidas foram lavadas com salina e um total de 3×10^5 células foi adicionado a cada poço de placas de cultura de 24 poços (Costar), previamente recobertos com lamínulas redondas (Glasstécnica). Alternativamente, utilizou-se um total de $1,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 48 poços. A aderência dos macrófagos foi feita por meio do cultivo em meio RPMI suplementado com 1% de meio Nutridoma (Roche), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 20 mM HEPES (todos da Invitrogen) por 24 horas em estufa a 37°C, 5% de CO₂.

5.3 Infecção de macrófagos

Após a aderência, os macrófagos foram colocados em contato com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* em uma proporção de 10 parasitas para 1 célula. A infecção foi feita por 24 horas, a 37°C com 5% de CO₂ e, em seguida, os poços foram lavados extensivamente com salina para retirar as promastigotas livres.

5.4 Obtenção de neutrófilos e indução de apoptose e morte

Os neutrófilos inflamatórios de camundongos BALB/c ou C57BL/6 foram obtidos por meio da injeção de 1 mL de tioglicolato (SIGMA) a 3% por via intraperitoneal (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Após 7 horas, o peritônio foi lavado com 5 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen) e, em seguida, as células obtidas foram, por sua vez, lavadas com salina e incubadas a 37°C por 1 hora para a separação das células não-aderentes. O grau de pureza de neutrófilos foi avaliado por meio de marcação das células com anticorpo anti-Gr1 (proteína ligada a GPI que reconhece especificamente neutrófilos na periferia) conjugado a FITC (BD Pharmingen). As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho FACSsort (Becton-Dickinson) e foram analisadas utilizando-se o programa Cell Quest (Becton-Dickinson).

A indução de apoptose dos neutrófilos foi feita por meio da exposição dessas células, por 10 minutos, à luz ultravioleta (UV) e posterior incubação por 2 horas a 37°C (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). A indução de morte dos neutrófilos foi feita por meio da incubação dos mesmos em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Para confirmar a indução de apoptose ou morte nos neutrófilos, estes foram marcados com Anexina-V conjugada a FITC (BD Pharmingen) e Iodeto de Propídeo (PI). As amostras foram adquiridas e analisadas como descrito acima. A marcação por

anexina-V serviu como indicativo de apoptose e a incorporação de PI foi usada como critério para determinação da morte celular. O número de células em apoptose foi em torno de 40-50% enquanto que o número de células mortas foi, após o tratamento com calor, sempre equivalente a 100%. Em seguida, os neutrófilos apoptóticos ou mortos foram colocados em contato com os macrófagos infectados e incubados por três dias ou seis dias a 37°C com 5% de CO₂

5.5 Cultura de células Jurkat

As células Jurkat (células de linhagem linfocitária) foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 20 mM Hepes (todos da Invitrogen). No momento do uso, as células foram lavadas a 1.500 rpm por 10 minutos com salina e ressuspensas em meio RPMI suplementado com 1% de Nutridoma. As células foram então adicionadas às culturas de macrófagos infectados, em uma proporção de 10 células Jurkat para 1 macrófago.

5.6 Determinação da taxa de infecção

Para determinar a taxa de infecção em co-culturas de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e neutrófilos ou células Jurkat, o meio de cultura RPMI foi substituído por meio Schneider após três dias de cultivo. As co-culturas foram incubadas por outros três dias, a 26°C. Após este período, o número de parasitas presente nos poços de cultura foi determinado por meio da contagem de promastigotas livres em câmara de Neubauer. A taxa de infecção também foi determinada por meio da coloração das lamínulas com Hematoxilina e Eosina. Para tal, as lamínulas foram removidas após 6 dias de co-cultura de macrófagos

infectados com *L. braziliensis* e neutrófilos ou células Jurkat. As contagens foram realizadas no microscópio ótico em lente de imersão. Pelo menos dez campos, escolhidos aleatoriamente, foram contados por cada lamínula e foram determinados tanto o número de macrófagos infectados quanto o número de amastigotas presentes em 100 células.

5.7 Dosagem de citocinas

Para avaliar a produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células, estimulamos os macrófagos infectados e co-cultivados com neutrófilos vivos, apoptóticos ou mortos com LPS (10ng/ml) de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4 (SIGMA L-4391). O sobrenadante de cultura foi coletado após 48 horas e utilizado para dosagem de citocinas utilizando o kit CBA - *Cytometric Bead Array* Th1/Th2 (BD Pharmingen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Este teste consiste em cinco populações de *beads* marcados com intensidades de fluorescência distintas de PE e recobertas com anticorpos de captura específicos para IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ e TNF- α . As 5 *beads* conjugadas com PE foram misturadas às amostras ou aos padrões e a mistura foi incubada por três horas. Em seguida, as amostras e os padrões foram centrifugados a 1.500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram ressuspensas no tampão de lavagem (BD Pharmingen). As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho FACScan (Becton-Dickinson) e os resultados foram analisados utilizando-se o programa *CBA Analysis Software* (Becton-Dickinson).

5.8 Caracterização dos neutrófilos

A caracterização dos neutrófilos em PMN tipo I ou tipo II foi feita como descrita em Tsuda *et al.*, 2004. Para isto, os neutrófilos foram obtidos por meio da injeção de 1 mL de tioglicolato (SIGMA) a 3% por via intraperitoneal (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004) ou por meio da injeção de 10^7 *L. braziliensis* por animal, também por via intraperitoneal. Após 7h, as células obtidas foram marcadas com anticorpos anti-Gr1 conjugado a PE e anti-CD49d conjugado a FITC (todos da BD Pharmingen). As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho FACSort (Becton-Dickinson) e foram analisadas utilizando-se o programa Cell Quest (Becton-Dickinson).

5.9 Co-inoculação de neutrófilos e *L. braziliensis*

Camundongos BALB/c (grupos de 15) foram co-inoculados, na derme da orelha, com promastigotas de *L. braziliensis* (10^5 /animal), em fase estacionária, e com neutrófilos (4×10^5 /animal), obtidos como descrito acima. As co-inoculações foram feitas utilizando-se agulhas de 29G e um volume de 10 μ l de solução. O grupo controle recebeu *L. braziliensis* (10^5 /animal) somente. A evolução da lesão foi monitorada com um paquímetro digital (PGC Scientifics) semanalmente.

5.10 Depleção de neutrófilos

Para a depleção de neutrófilos, os camundongos foram tratados a cada três dias, durante quinze dias, com 500 μ g do anticorpo RB6-8C5 (gentilmente cedido pelo Dr. André Báfica). O tratamento foi iniciado um dia antes da infecção com *L. braziliensis*. A neutropenia sangüínea foi mantida por pelo menos 4 dias após a injeção do anticorpo e foi confirmada por meio da contagem de leucócitos em esfregaço

sangüíneo corado com HE. Como controle, camundongos foram tratados com IgG total de rato (SIGMA).

5.11 Carga parasitária

A carga parasitária dos animais co-inoculados com neutrófilos e *L. braziliensis* e de animais depletados de neutrófilos foi estimada por meio de diluição limitante como descrito por Titus *et al.* (1985). Brevemente, a orelha infectada e os linfonodos de drenagem foram retirados e homogeneizados em meio Schneider (Sigma) suplementado como descrito anteriormente. A partir do homogeneizado inicial, foram realizadas 8 diluições seriadas, as quais foram aplicadas em placas de 96 poços contendo meio ágar-sangue. O número de parasitas viáveis foi determinado pela máxima diluição na qual foram encontrados, após uma semana de incubação a 25°C. Os resultados encontrados foram analisados utilizando o programa ELIDA.

5.12 Análise estatística.

Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas utilizando diferentes testes a depender dos dados obtidos. Para múltiplas comparações foi utilizado Kruskal-Wallis e para comparações entre dois grupos foi realizado Teste t de Student com intervalo de confiança de 95% sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Purificação de neutrófilos peritoniais.

Neutrófilos recrutados por meio da injeção intraperitoneal de tioglicolato foram separados de outros tipos celulares por aderência. O grau de pureza da preparação foi determinado por citometria de fluxo, por meio da marcação com anticorpo anti-Gr1 (marcador de granulócitos maduros). Como mostrado na Fig. 2, observamos que o grau de pureza dos neutrófilos obtidos variou entre 75 a 85% nos ensaios realizados.

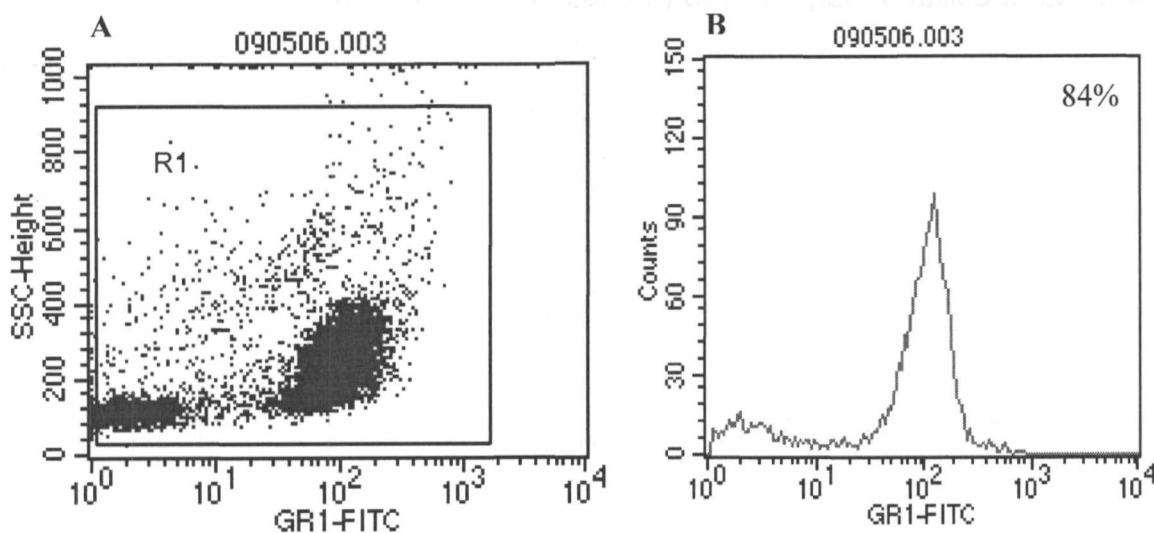


Figura 2. Pureza de neutrófilos obtidos após a injeção de tioglicolato. Camundongos BALB/c foram injetados com tioglicolato a 3% por via intraperitoneal. Após 7 horas de estímulo, as células recrutadas foram marcadas com anticorpo anti-Gr1. (A) representação por citofluorimetria (FACS) das células marcadas com Gr1 (Dot plot de granulosidade -SSC x fluorescência - GR1⁺). (B) Histograma relativo à figura A (Intensidade de fluorescência verde (FITC) conjugada ao anticorpo monoclonal Gr1). Os dados apresentados são representativos de um experimento realizado.

6.2 Indução de apoptose e morte de neutrófilos peritoniais.

Após a separação por aderência, os neutrófilos recrutados sofreram tratamentos para indução de morte celular por calor ou apoptose por luz ultravioleta. Como mostrado na Fig. 3, observamos que as células tratadas com luz UV não incorporam PI, o que garante permeabilidade seletiva na membrana. Além disso, a marcação por anexina-V variou entre 40-50% nos neutrófilos tratados com luz UV nos ensaios realizados. Por outro lado, as células que sofreram indução de morte por calor tinham, em sua maioria, marcação para anexina-V, em torno de 95% nos ensaios realizados (Fig. 3). Na mesma figura, observamos que todas as células que sofreram este tratamento incorporam PI, caracterizando perda da permeabilidade seletiva da membrana.

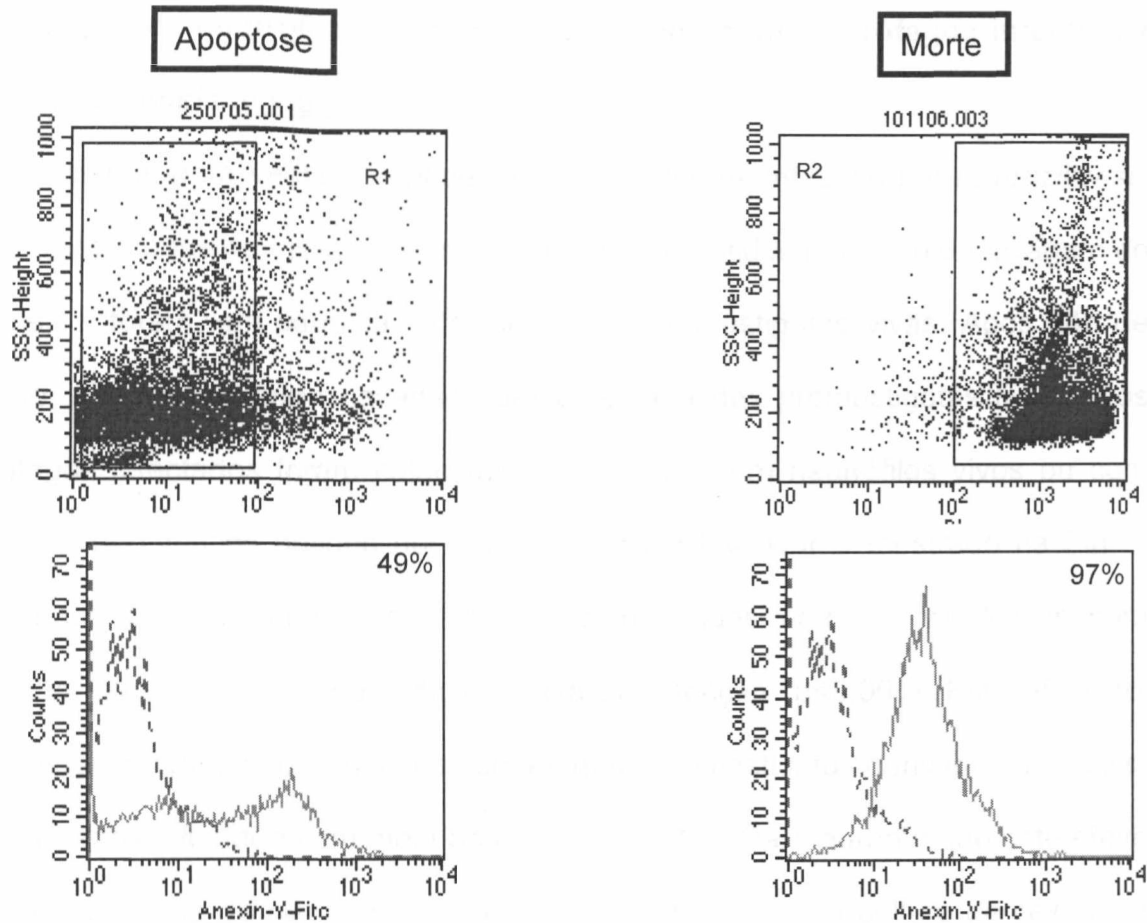


Figura 3. Indução de apoptose e morte de neutrófilos peritoniais. Camundongos BALB/c foram injetados com tioglicolato a 3% por via intraperitoneal. Após a purificação dos neutrófilos, foram realizados os tratamentos de apoptose ou morte celular. A apoptose foi induzida por luz ultravioleta e as células foram marcadas com anexina V e PI. A indução de morte foi realizada através da incubação das células a 56°C por 30 minutos. Os dados apresentados são representativos de um experimento realizado.

6.3 Interação de neutrófilos vivos ou apoptóticos com macrófagos infectados com *L. braziliensis* in vitro.

Inicialmente, para verificar o papel dos neutrófilos na infecção por *L. braziliensis* in vitro, macrófagos de camundongos BALB/c foram obtidos por meio da lavagem do peritônio e foram, em seguida, infectados com promastigotas vivas. Após 24h de infecção, as culturas foram lavadas para a retirada das promastigotas livres e os macrófagos infectados foram colocados em contato com neutrófilos vivos ou com neutrófilos apoptóticos obtidos por exposição à luz UV. Como mostrado na Fig. 4 observamos que o contato de macrófagos infectados com *L. braziliensis* com neutrófilos vivos foi capaz de reduzir a taxa de infecção ($p < 0.001$). Este efeito foi primeiramente avaliado por meio da contagem de promastigotas derivados do cultivo de macrófagos infectados em meio Schneider (Fig. 4A). Para garantir que este efeito não era decorrente da permanência de promastigotas livres na cultura de células, a taxa de infecção também foi avaliada por meio da contagem dos amastigotas presentes no interior dos macrófagos. Como mostrado na Fig. 4B, novamente observamos que a co-cultura de macrófagos infectados com *L. braziliensis* com neutrófilos vivos foi capaz de reduzir a taxa de infecção ($p < 0.001$). O mesmo efeito pôde ser observado quando determinados o número de amastigotas presentes nos macrófagos infectados (Fig. 4C). No entanto, quando os macrófagos infectados com *L. braziliensis* foram incubados com neutrófilos apoptóticos, não houve alteração significativa na carga parasitária, seja pela contagem de promastigotas ou pela determinação da taxa de infecção (Fig. 4). Portanto, a adição de PMN apoptóticos não interferiu na infecção de macrófagos por *L. braziliensis*.

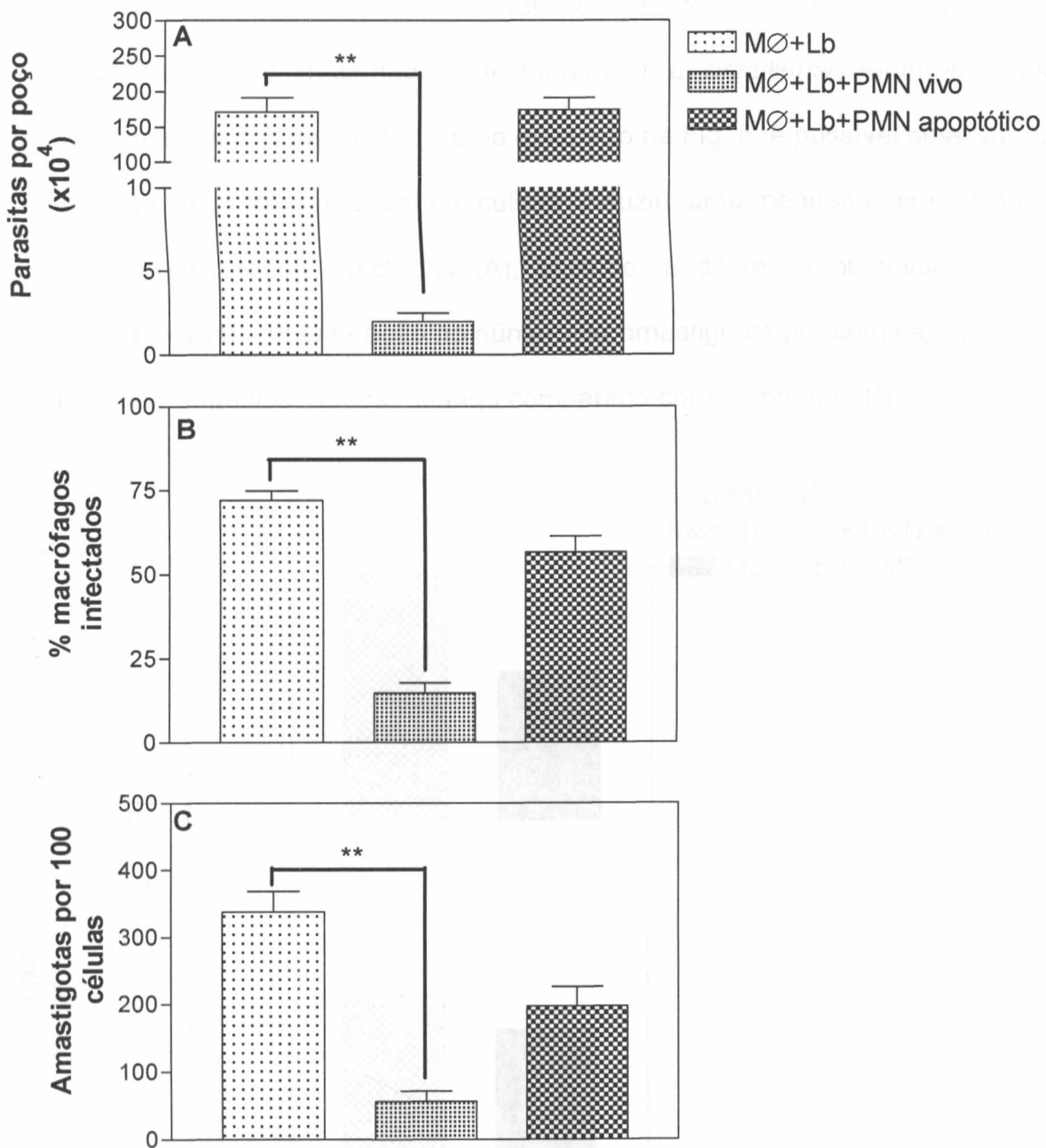


Figura 4. Neutrófilos vivos reduzem a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. braziliensis*. Os macrófagos de camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* e foram, em seguida, co-cultivados com neutrófilos vivos ou apoptóticos. A taxa de replicação das promastigotas foi mensurada por meio do cultivo em meio Schneider (A). A taxa de infecção (B) e o número de amastigotas (C) foram avaliados pela contagem em lamínulas coradas com HE por microscopia ótica. Os resultados são representativos de três experimentos realizados separadamente e representam a média e desvio padrão de culturas feitas em triplicata. **** $p < 0.001$.**

Em seguida, decidimos avaliar o efeito de neutrófilos mortos na infecção de macrófagos. Para isto, macrófagos infectados com *L. braziliensis* foram incubados com neutrófilos mortos pelo calor. Como mostrado na Fig. 5, é possível observar que a adição de neutrófilos mortos na cultura induziu uma pequena diminuição no número de macrófagos infectados (A), contudo, a diferença observada não foi significativa. Não houve alteração no número de amastigotas por cem células após o contato com neutrófilos mortos, quando comparado com o controle (B).

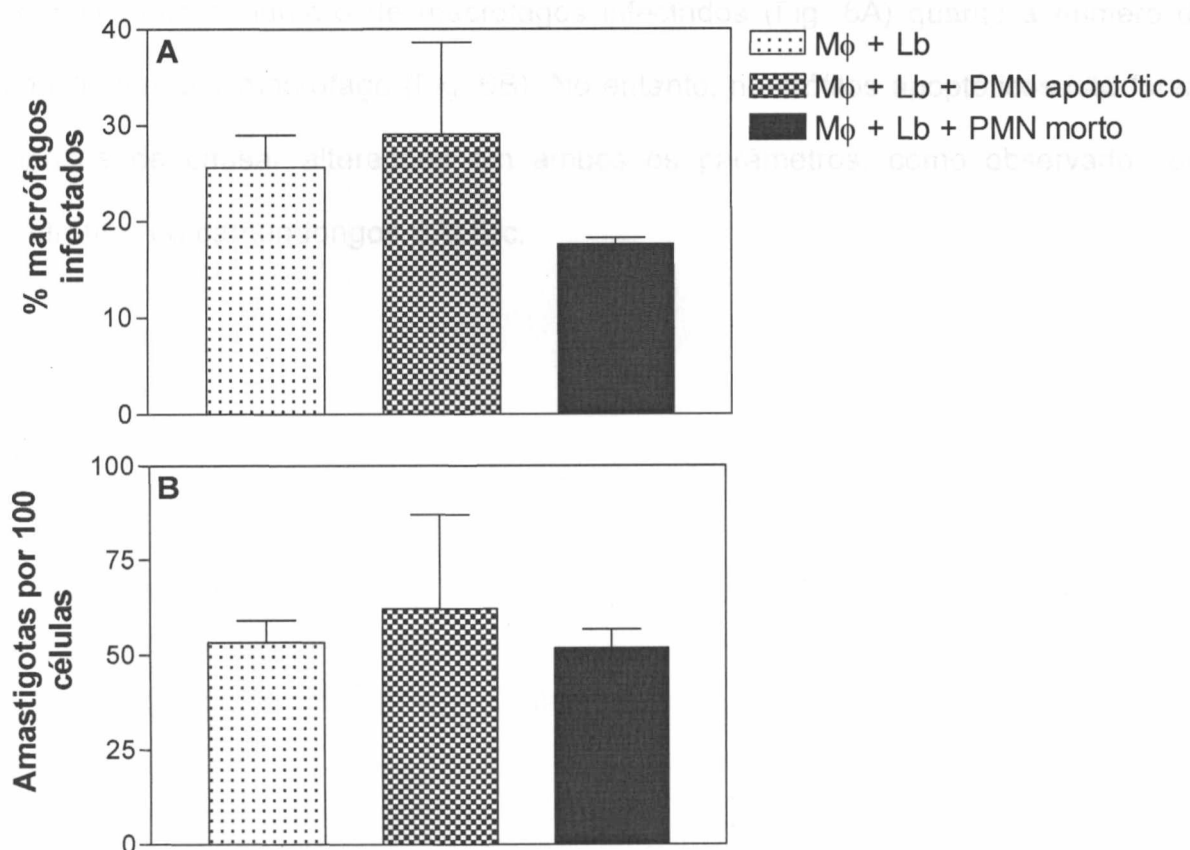


Figura 5. Neutrófilos mortos não reduzem a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. braziliensis*. Os macrófagos de camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* e foram, em seguida, co-cultivados com neutrófilos mortos. A taxa de infecção (A) e o número de amastigotas (B) foram avaliados pela contagem em lamínulas coradas com HE por microscopia ótica. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente e representam a média e desvio padrão de culturas feitas em triplicata.

Nosso próximo passo foi avaliar se neutrófilos provenientes de camundongos de outra linhagem teriam o mesmo efeito sobre macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Para isto, foram adicionados à cultura de macrófagos infectados neutrófilos obtidos de camundongos C57BL/6. Estes foram induzidos a entrar em apoptose como descrito anteriormente. Como mostrado na Fig. 6, o efeito na infecção foi similar ao obtido com neutrófilos de camundongos BALB/c. Assim, a presença de neutrófilos vivos de camundongos C57BL/6 também foi capaz de diminuir tanto o número de macrófagos infectados (Fig. 6A) quanto a número de amastigotas por macrófago (Fig. 6B). No entanto, neutrófilos apoptóticos não foram capazes de causar alterações em ambos os parâmetros, como observado com neutrófilos de camundongos BALB/c.

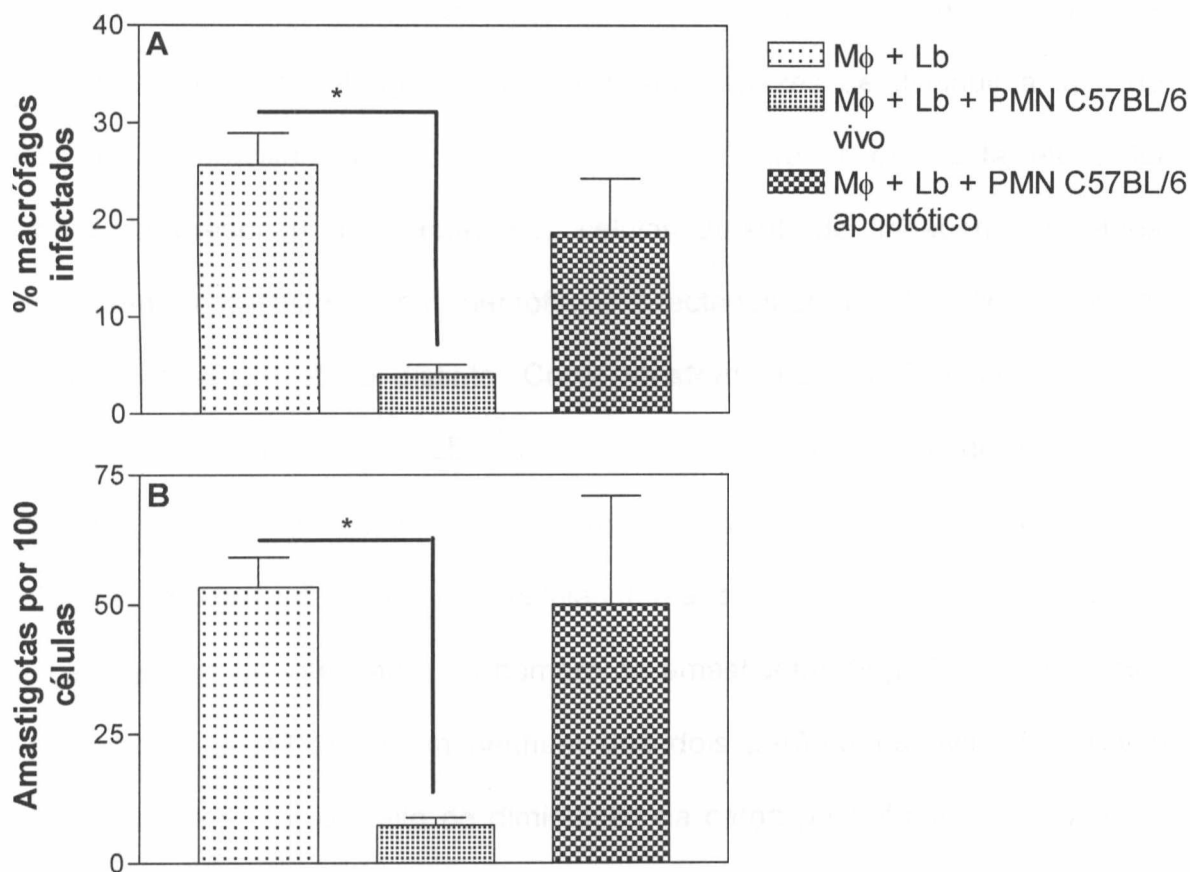


Figura 6. Neutrófilos vivos de camundongos C57BL/6 reduzem a infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. braziliensis*. Os macrófagos de camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* e, em seguida, foram co-cultivados com neutrófilos de camundongos C57BL/6. A taxa de infecção (A) e o número de amastigotas (B) foram avaliados pela contagem em lamínulas coradas com HE por microscopia ótica. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente e representam a média e desvio padrão de culturas feitas em triplicata. * $p < 0,05$.

Os experimentos *in vitro* mostraram que neutrófilos vivos, tanto de camundongos BALB/c quanto de camundongos C57BL/6, foram capazes de diminuir a taxa de infecção de *L. braziliensis* em macrófagos. Para garantir que este efeito foi decorrente da presença dos neutrófilos, células Jurkat, de linhagem linfocitária humana, foram co-cultivadas com macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Neste caso, observamos um efeito distinto. Como mostrado na Fig. 7, o co-cultivo de macrófagos de camundongos BALB/c com células Jurkat vivas não alterou a taxa de infecção (Fig. 7A) bem como o número de amastigotas (Fig. 7B). Por outro lado, o cultivo de macrófagos infectados com células Jurkat apoptóticas levou a uma ligeira diminuição na taxa de infecção e no número de amastigotas (Fig. 7), contudo, esta diferença não foi significativa em nenhum dos dois parâmetros avaliados. Estes resultados sugerem que o efeito de diminuição da carga parasitária observada em macrófagos infectados com *L. braziliensis* ocorre somente na presença de neutrófilos.

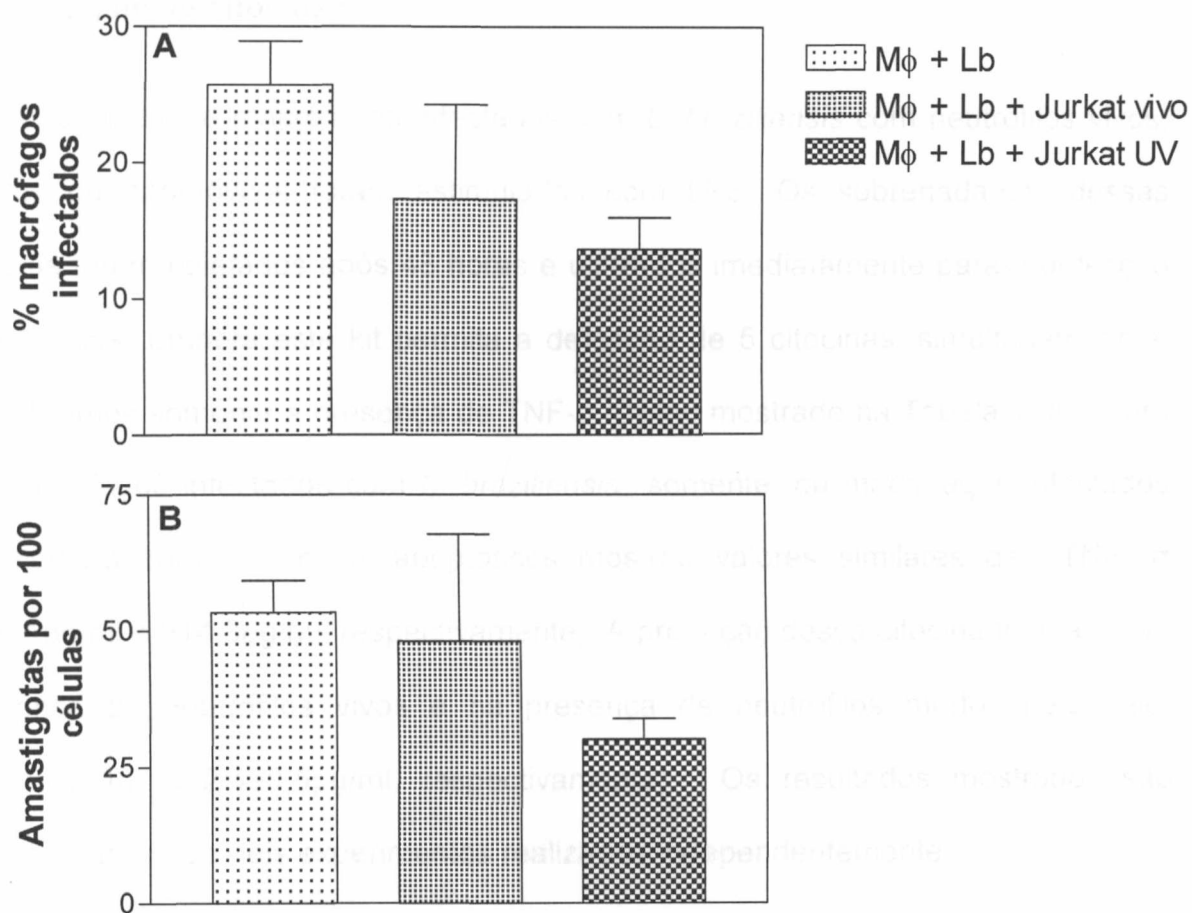


Figura 7. Células Jurkat vivas não alteram a infecção de macrófagos com *L. braziliensis*. Os macrófagos de camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* e foram, em seguida, co-cultivados com células Jurkat vivas ou apoptóticas. A taxa de infecção (A) e o número de amastigotas (B) foram avaliados pela contagem em lamínulas coradas com HE por microscopia ótica. Os resultados são representativos de dois experimentos realizados separadamente e representam a média e desvio padrão de culturas feitas em triplicata.

6.4 Dosagem de citocinas.

As culturas de macrófagos infectados com *L. braziliensis* com neutrófilos vivos, mortos ou apoptóticos foram estimuladas com LPS. Os sobrenadantes dessas culturas foram coletados após 48 horas e utilizados imediatamente para a detecção de citocinas. Embora este kit permita a detecção de 5 citocinas, simultaneamente, identificamos somente a presença de TNF- α . Como mostrado na Tabela 1, a cultura de macrófagos infectados com *L. braziliensis* somente, ou macrófagos infectados em contato com neutrófilos apoptóticos mostrou valores similares de TNF- α (930,1pg/ml e 914,8pg/ml, respectivamente). A produção dessa citocina foi maior na presença de neutrófilos vivos e na presença de neutrófilos mortos pelo calor (>2.500pg/ml e 2.490,5pg/ml, respectivamente). Os resultados mostrados são representativos de dois experimentos realizados independentemente.

TABELA 1 – Produção de TNF- α em macrófagos infectados em contato com neutrófilos vivos, apoptóticos e mortos.

Condição	TNF- α	
	MFI	pg/ml
MØ + Lb	23,9	930,1
MØ + Lb + PMN vivo	56,2	>2500
MØ + Lb + PMN apoptótico	23,7	914,8
MØ + Lb + PMN morto	40,9	2490,5

6.5 Caracterização dos neutrófilos recrutados por *L. braziliensis*.

Para caracterizar os tipos de neutrófilos, baseado no trabalho de Tsuda *et al.*, 2004, e determinar se os neutrófilos recrutados por tioglicolato pertencem ao mesmo subtipo daqueles recrutados por *L. braziliensis*, injetamos 10^7 promastigotas em fase estacionária ou tioglicolato a 3% no peritônio de camundongos BALB/c. Uma característica importante que diferencia estes dois tipos de neutrófilos é a presença de marcadores de superfície, sendo o CD49d⁺ marcador dos neutrófilos do tipo I e o CD11b⁺ o marcador de neutrófilos do tipo II. Sendo assim, a caracterização dos neutrófilos recrutados por *L. braziliensis* e por tioglicolato foi realizada através da marcação simultânea com os anticorpos Gr1⁺ e CD11b⁺ ou CD49d⁺. Como mostrado na Fig. 8, ambos estímulos recrutam o mesmo tipo de neutrófilo, o qual foi caracterizado como sendo, em sua maioria, CD11b⁺, ou seja, neutrófilos do tipo II. Portanto, é possível concluir que os neutrófilos utilizados nos experimentos com tioglicolato têm o mesmo perfil daqueles recrutados por *L. braziliensis*, sendo esses neutrófilos CD11b⁺.

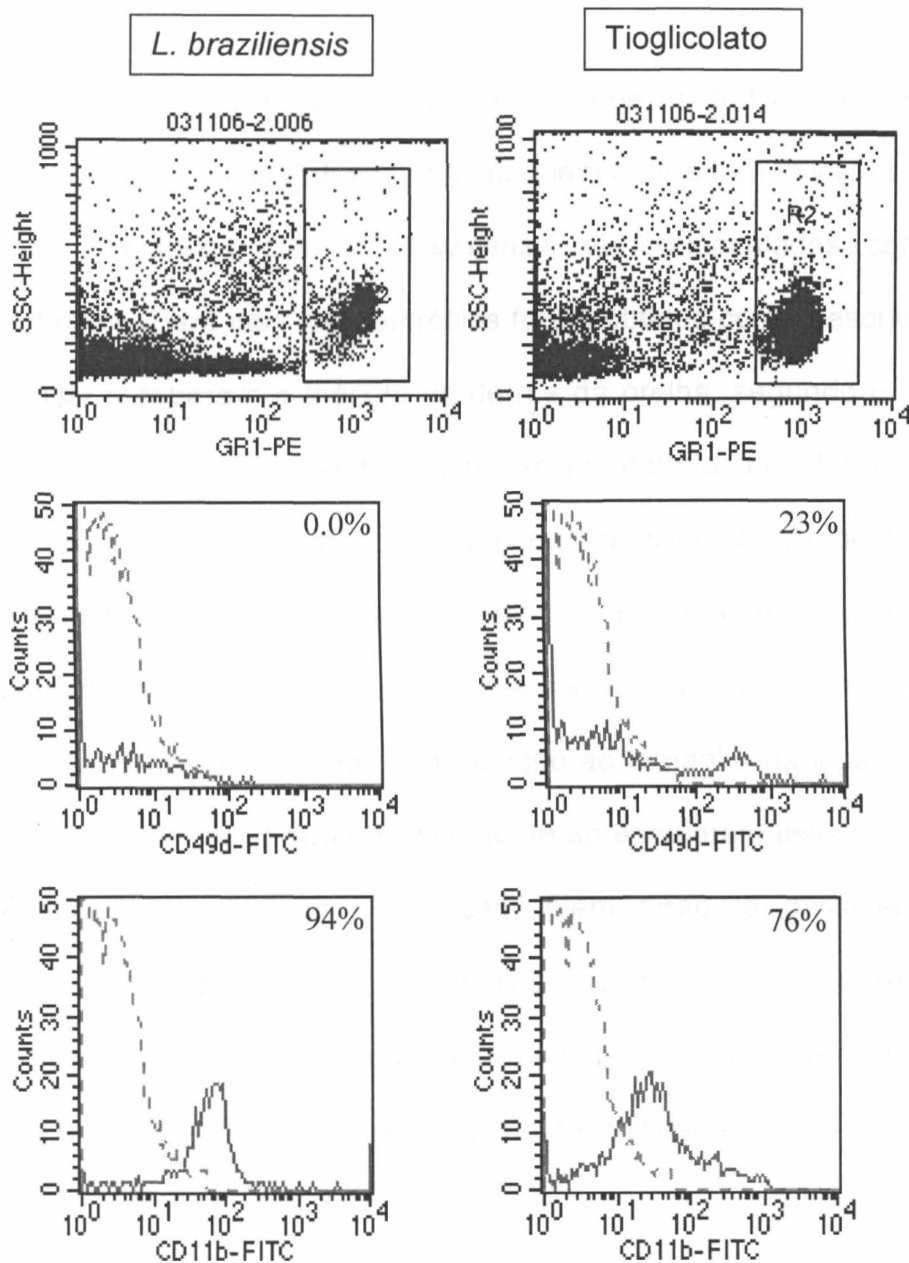


Figura 8. Caracterização de neutrófilos recrutados por *L. braziliensis* e tioglicolato. Neutrófilos foram recrutados para o peritônio de camundongos BALB/c por meio da injeção de 10^7 *L. braziliensis* ou tioglicolato a 3%. As células foram coletadas e marcadas, simultaneamente, com anticorpos anti-Gr1 e anti-CD11b (linha vermelha) ou anti-CD49d (linha verde) para caracterização dos tipos de neutrófilos. Os resultados são de um experimento representativo de dois experimentos realizados independentemente.

6.5. Efeito da co-inoculação de neutrófilos vivos na infecção por *L. braziliensis* *in vivo*

Para avaliar se os efeitos da presença de neutrófilos vivos sobre a infecção por *L. braziliensis*, observados *in vitro*, também ocorreriam *in vivo*, camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* ou co-inoculados com *L. braziliensis* + neutrófilos. Para isso, os neutrófilos foram obtidos como descrito anteriormente e os animais receberam o inóculo na derme da orelha, segundo o modelo experimental recentemente desenvolvido em nosso laboratório (de Moura *et al.*, 2005). Como mostrado na Fig. 9, a co-inoculação de *L. braziliensis* com neutrófilos vivos foi capaz de retardar o aparecimento da lesão por 8 semanas, enquanto que, em animais controle, inoculados com *L. braziliensis* apenas, a mesma apareceu cerca de 5 semanas após a infecção. Com relação ao tamanho da lesão, observamos animais inoculados com *L. braziliensis* somente apresentaram lesões maiores ($p < 0,05$) nas semanas 6 e 7 após a infecção. Além disso, é possível notar que a lesão desenvolvida por animais co-inoculados com neutrófilos vivos e *L. braziliensis* foi sempre menor quando comparada àquela observada dos animais controle, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa.

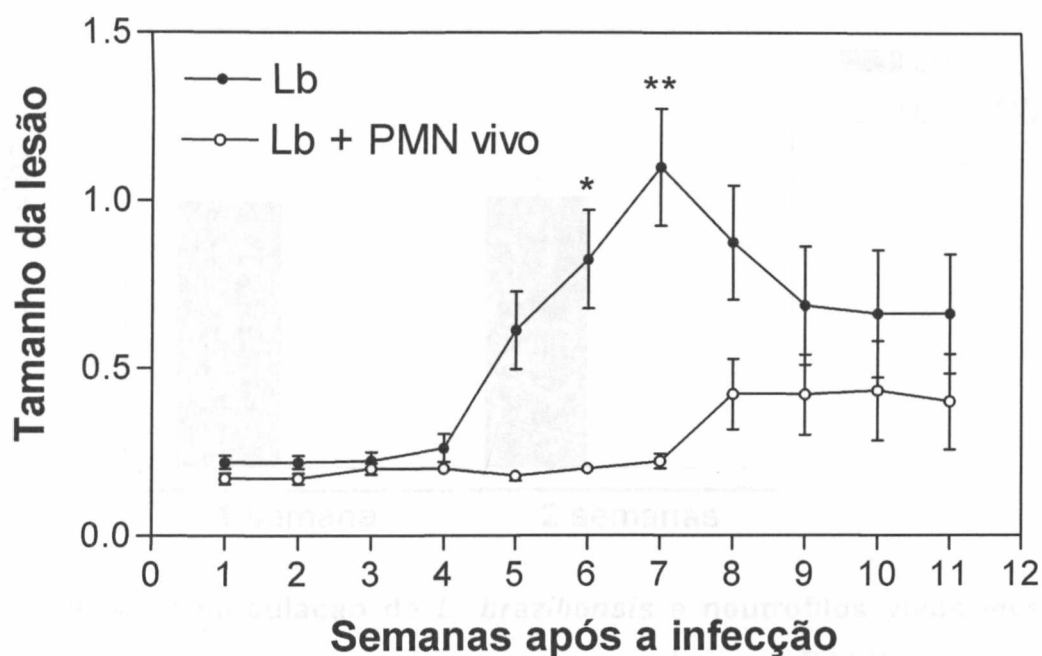


Figura 9. A co-inoculação de neutrófilos vivos e *L. braziliensis* em camundongos BALB/c diminui o tamanho da lesão. Camundongos BALB/c foram infectados, na derme da orelha, com 10^5 *L. braziliensis* ou com 10^5 *L. braziliensis* + 5×10^5 neutrófilos. A orelha dos animais foi mensurada semanalmente. Os dados mostrados representam a média \pm desvio padrão e são representativos de três experimentos realizados independentemente, cada um com 5 animais por grupo. * $p < 0,05$.

Para verificar se a co-inoculação de neutrófilos e *L. braziliensis* traria reflexos também na carga parasitária no sítio de infecção, os animais foram sacrificados após uma e duas semanas de infecção. A quantidade de parasitas foi determinada pelo método de diluição limitante. Como mostrado na Fig. 10, camundongos inoculados com *L. braziliensis* somente apresentaram parasitas na orelha infectada enquanto que os mesmos não puderam ser detectados em animais que foram co-inoculados com neutrófilos vivos e *L. braziliensis*. Já no linfonodo de drenagem, não detectamos parasitas em nenhum dos dois grupos.

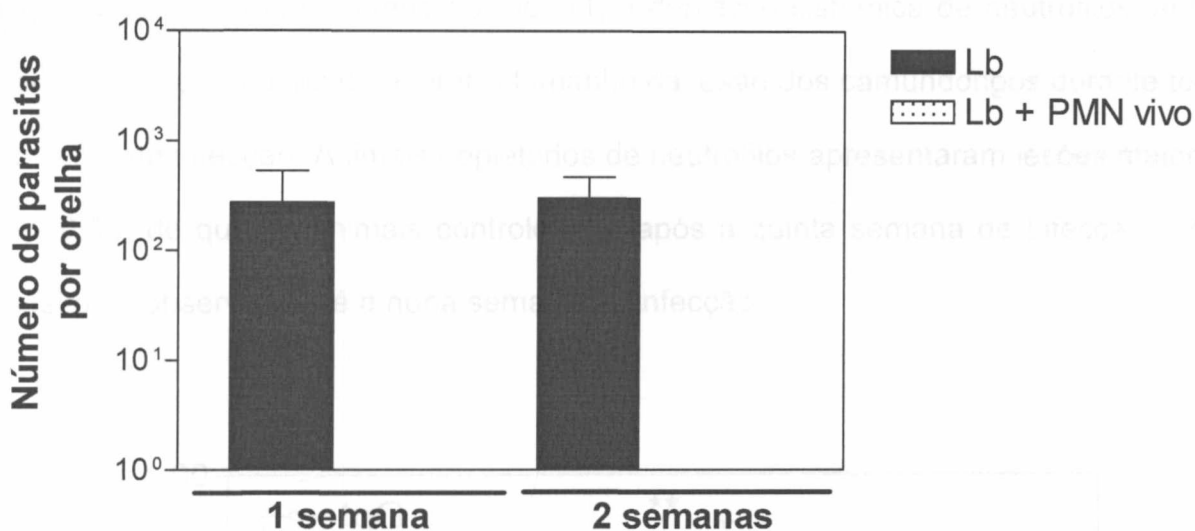


Figura 10. A co-inoculação de *L. braziliensis* e neutrófilos vivos leva a uma diminuição na carga parasitária em camundongos BALB/c. Camundongos BALB/c foram infectados com 10^5 *L. braziliensis* ou com 10^5 *L. braziliensis* + 5×10^5 neutrófilos vivos. A carga parasitária da orelha foi determinada por diluição limitante. Os dados mostrados, média \pm desvio padrão, são referentes a um experimento representativo de 3 experimentos realizados independentemente, cada um com 3 camundongos por grupo.

6.6. Efeito da depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*

Para determinar a importância do recrutamento inicial de neutrófilos ao sítio de infecção, camundongos BALB/c foram depletados de neutrófilos e, em seguida, foram infectados com *L. braziliensis* na derme da orelha. O tratamento de depleção foi continuado durante os primeiros 15 dias após a infecção por *L. braziliensis*. A depleção de neutrófilos foi feita por meio da injeção intraperitoneal do anticorpo RB6-8C5, o qual é capaz de eliminar neutrófilos circulantes, e foi confirmada por meio da contagem de leucócitos presentes em esfregaços do sangue dos animais depletados. Observamos que a depleção teve duração de até 4 dias após a sua injeção (dados não mostrados). Os animais controle receberam a mesma dose de

IgG de rato. Como mostrado na Fig. 11, a depleção sistêmica de neutrófilos, antes da infecção, foi capaz de alterar o tamanho da lesão dos camundongos durante todo o curso da infecção. Animais depletados de neutrófilos apresentaram lesões maiores ($p < 0.05$) do que os animais controle logo após a quinta semana de infecção. Este efeito foi observado até a nona semana de infecção.

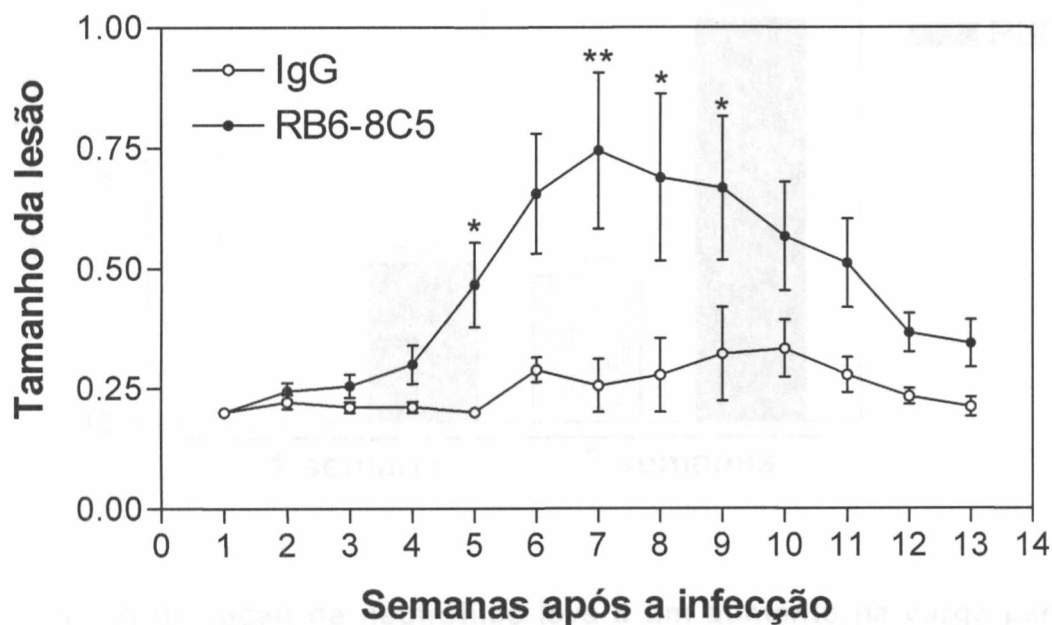


Figure 11. A depleção de neutrófilos exacerba a lesão em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Os camundongos foram depletados de neutrófilos por injeção intraperitoneal de RB6-8C5. Animais controle foram injetados com a mesma dose de IgG de rato. Os camundongos foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* e o desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente. Os dados mostrados em milímetros representam a média \pm desvio padrão e são representativos de três experimentos realizados independentemente, cada um com 5 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0.001$.

Para confirmar se a depleção de neutrófilos também teria efeito sobre o número de parasitas presentes no sítio de infecção, camundongos foram sacrificados, uma e

duas semanas após a infecção, para determinação da carga parasitária. Como mostrado na Fig. 12, observamos que camundongos depletados de neutrófilos apresentaram uma carga parasitária maior ($p < 0,05$), tanto uma e duas semanas após a infecção, quando comparado com animais controle.

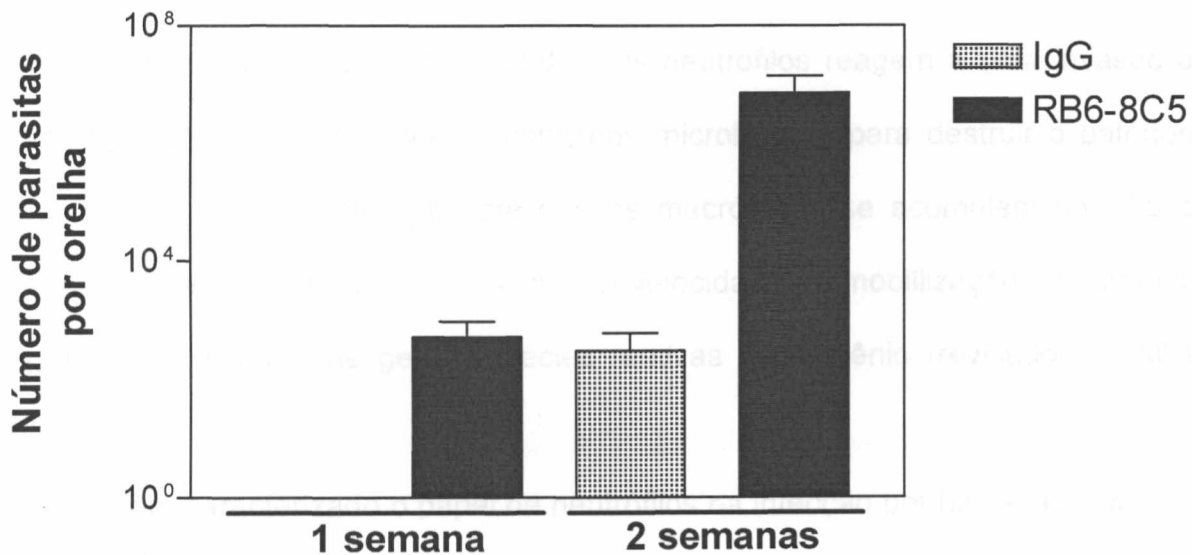


Figura 12. A depleção de neutrófilos leva a um aumento na carga parasitária em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*. Os camundongos foram depletados de neutrófilos por injeção intraperitoneal de RB6-8C5. Animais controle foram injetados com a mesma dose de IgG de rato. Os camundongos foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* e a carga parasitária foi determinada por diluição limitante. Os dados mostrados, média \pm desvio padrão, são referentes a um experimento representativo de 3 experimentos realizados independentemente, cada um com 3 camundongos por grupo. $p < 0,05$.

7 DISCUSSÃO

Neutrófilos e macrófagos são considerados fagócitos profissionais e são células fundamentais do sistema imune inato. Estas células apresentam receptores especializados para reconhecer seus alvos e esta maquinaria está envolvida na internalização de patógenos e dá início aos mecanismos de destruição das partículas fagocitadas (Lee *et al.*, 2003). Os neutrófilos reagem a uma invasão de microorganismos usando seus mecanismos microbicidas para destruir o patógeno e/ou prevenir a sua replicação, até que os macrófagos se acumulem no sítio de infecção. Estes mecanismos envolvem alta velocidade de mobilização dos grânulos e grande capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (revisado em Allen, 2003).

Já é bem caracterizado o papel de neutrófilos na infecção por bactérias. Sabe-se, por exemplo, que camundongos depletados de neutrófilos e infectados com *Legionella pneumophila* são mais suscetíveis à infecção (Tateda *et al.*, 2001). Neste trabalho foi observado que animais controle apresentavam altos níveis de citocinas como IFN- γ e IL-12, enquanto que os animais depletados apresentavam níveis mais exacerbados de IL-4 e IL-10. Apesar da depleção de neutrófilos nestes animais não alterar o número de bactérias nos pulmões, foi demonstrada uma clara correlação entre a presença de neutrófilos e uma polarização da resposta imune para o tipo Th1.

Com relação à infecção por *Leishmania*, dados da literatura têm demonstrado que, em camundongos, há recrutamento intenso de neutrófilos 48-72 horas após a infecção por *L. major* (Pompeu *et al.*, 1991) e *L. amazonensis* (Grimaldi *et al.*, 1984). Algumas horas após a migração para o tecido, os neutrófilos entram

espontaneamente em apoptose. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos previne a liberação de substâncias intracelulares potencialmente tóxicas no ambiente externo além de regular a resposta inflamatória desencadeada por infecções (revisado em Fadok *et al.*, 2001). Ribeiro-Gomes e colaboradores (2004) demonstraram que neutrófilos de BALB/c e C57BL/6 têm papéis diferentes frente à infecção por *L. major*. Macrófagos de BALB/c infectados com *L. major* apresentam um aumento na taxa de infecção quando colocados em contato com neutrófilos mortos. Este efeito parece ser dependente da produção de TGF- β e PGE₂. O inverso é observado nos macrófagos de C57BL/6, os quais apresentam uma redução na infecção quando em contato com neutrófilos mortos. Neste caso, foi observado que a capacidade de eliminação dos parasitas por estas células é dependente da produção de TNF- α e de elastase neutrofílica. Neste trabalho, os autores sugerem que estas duas linhagens de camundongos possuem perfis diferentes quanto à produção de mediadores inflamatórios frente à infecção por *L. major*.

Em trabalhos recentes do nosso laboratório, utilizando neutrófilos humanos, observou-se que existe um aumento na carga parasitária de macrófagos infectados com *L. amazonensis* quando estes são co-cultivados com neutrófilos apoptóticos e que este é um mecanismo dependente de TGF- β e PGE₂ (Afonso *et al.*, 2006, enviado para publicação). Neste mesmo trabalho, foi observado que neutrófilos mortos levam a uma diminuição na infecção por *L. amazonensis*. Neste caso, a produção de elastase neutrofílica e TNF- α é fundamental para que haja eliminação dos parasitas pelos macrófagos humanos.

Nossos resultados mostram que existe um efeito diferenciado de neutrófilos vivos ou apoptóticos na eliminação de *L. braziliensis* por macrófagos peritoniais de camundongos BALB/c. Quando estes macrófagos infectados são colocados em

contato com neutrófilos vivos, existe uma diminuição significativa na taxa de infecção bem como no número de amastigotas por células. É possível que os neutrófilos vivos em contato com macrófagos infectados sejam capazes de ativar estas células através da liberação de mediadores inflamatórios, como observado no trabalho de (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Em nosso trabalho, também observamos que neutrófilos mortos diminuem a taxa de infecção quando co-cultivados com macrófagos infectados com *L. braziliensis*, assim como foi observado com neutrófilos vivos, no entanto, esta diferença não foi significativa. Por outro lado, não observamos diferenças na infecção quando a co-cultura foi feita com neutrófilos apoptóticos.

Observamos também que o efeito de diminuição da taxa de infecção na co-cultura de macrófagos infectados e neutrófilos vivos independe da linhagem de camundongos da qual se origina o neutrófilo: neutrófilos de camundongos C57BL/6 induziram o mesmo efeito em macrófagos de BALB/c infectados. Contudo, este parece ser um papel exclusivo de neutrófilos, já que a adição de células Jurkat, de linhagem linfocitária, não alterou a infecção dos macrófagos. Portanto, na infecção por *L. braziliensis*, neutrófilos vivos desempenham um papel importante na diminuição da taxa de infecção.

Sabe-se que o TNF- α é um potente mediador inflamatório capaz de estimular monócitos, eosinófilos, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos *in vitro* (revisado em Beutler & Cerami, 1988). Com relação a leishmaniose tegumentar experimental, Titus *et al.* (1989) demonstraram que camundongos C3H/HeJ, resistentes à infecção por *L. major*, produzem grandes quantidades de TNF- α durante todo o curso da infecção. Em contraste, em camundongos BALB/c infectados com *L. major* esta citocina não foi detectada. Sabe-se também que a fagocitose de células apoptóticas

por macrófagos *in vitro* inibe a produção de TNF- α (Fadok *et al.*, 1998). No nosso trabalho, observamos que na co-cultura de macrófagos infectados com *L. braziliensis* com neutrófilos vivos ou mortos levou à produção de altos níveis de TNF- α . Contudo, esta produção foi suprimida na presença de neutrófilos apoptóticos. Portanto, o TNF- α parece ser um mediador importante para o controle da infecção por *L. braziliensis*, assim como foi demonstrado nos trabalhos com *L. major* (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004) e *L. amazonensis* (Afonso *et al.*, 2006, enviado para publicação). No entanto, é importante lembrar que a presença de neutrófilos mortos não foi capaz de diminuir a taxa de infecção, indicando que outros fatores devem colaborar na eliminação do parasita. Será importante confirmar o papel do TNF- α por meio da utilização de anticorpos neutralizantes, por exemplo.

Aga e colaboradores (2002) demonstraram que a apoptose de neutrófilos é retardada quando estas células entram em contato com promastigotas de *Leishmania*. Além disso, neste trabalho, os autores foram capazes de encontrar neutrófilos infectados na pele de camundongos após três dias da infecção, sugerindo que este efeito também é observado *in vivo*. No que diz respeito à infecção por *L. braziliensis*, o retardo na indução de apoptose de neutrófilos no momento da infecção induziria, em curto prazo, uma eliminação parasitária mais eficaz. Neste sentido, observamos que neutrófilos vivos são capazes de induzir a morte desses parasitas em macrófagos infectados. Mais tarde, este mesmo grupo mostrou que neutrófilos infectados com *L. major* liberam MIP-1 β , uma quimiocina capaz de atrair macrófagos e mostrou que os macrófagos fagocitam neutrófilos infectados, levando à liberação de TGF- β (van Zandbergen *et al.*, 2004). Este artigo lançou a hipótese do “Cavalo de Tróia” pela qual os neutrófilos infectados entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos, permitindo a entrada silenciosa do

parasita na célula hospedeira definitiva. Contudo, ainda não se sabe em que proporção este efeito é observado *in vivo* e se isto ocorre também com outras espécies de *Leishmania*.

Foi demonstrada a importância dos neutrófilos na eliminação de parasitas nos momentos iniciais após a infecção por *L. infantum*. A depleção de neutrófilos em momentos iniciais após a infecção foi capaz de aumentar 10 vezes a carga parasitária no baço (Rousseau *et al.*, 2001). Tacchini-Cottier e colaboradores, em 2000, publicaram um trabalho no qual estudaram o papel do neutrófilo *in vivo* durante a infecção por *L. major*. A partir dos seus resultados foi possível concluir que a depleção de neutrófilos foi benéfica para os camundongos BALB/c, pois resultou na diminuição da lesão destes animais. Na ausência de neutrófilos, não existe uma alta produção de IL-4 nas primeiras horas após a infecção, como foi observado nos animais controle. Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004, também demonstraram que a depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c infectados com *L. major* induz uma menor carga parasitária, no linfonodo de drenagem, após 13 dias de infecção.

Nossos resultados mostram que a depleção de neutrófilos interfere de maneira importante no desenvolvimento da lesão dos camundongos infectados com *L. braziliensis*. Os animais depletados dessas células desenvolveram uma lesão maior durante todo o curso da infecção e apresentaram uma maior carga parasitária quando comparado como os camundongos controle. Além disso, observamos também que a co-inoculação de neutrófilos vivos com *L. braziliensis* foi capaz de inibir o desenvolvimento da lesão cutânea, o que pôde ser associado à eliminação de parasitas nas primeiras semanas após a infecção. Entretanto, o efeito “microbicida” decorrente da co-inoculação de neutrófilos desaparece após cerca de

oito semanas de infecção, quando foi possível detectar um pequeno aumento na espessura da orelha.

É preciso deixar claro que o modelo de infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* é um modelo de resistência à infecção. Embora os animais desenvolvam lesões ulceradas, estas curam espontaneamente com o passar das semanas (de Moura *et al.*, 2005). Isto poderia explicar as diferenças encontradas no efeito dos neutrófilos frente à infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis* e *L. major*. Camundongos BALB/c não são capazes de eliminar *L. major in vivo* (revisado em Sacks & Noben-Trauth, 2002) e, nesta infecção, os neutrófilos parecem contribuir com a permanência do parasita por meio da indução da produção de IL-4 (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000) e por meio da produção de TGF- β e PGE₂, após a sua fagocitose por macrófagos (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Os resultados mostrados aqui reforçam a idéia que, na infecção por *L. braziliensis*, os mecanismos de eliminação de parasitas pelo contato de macrófagos infectados com neutrófilos seriam similares àqueles descritos por Ribeiro-Gomes e colaboradores (2004), com camundongos C57BL/6. Desta forma, parece que o parasita é fundamental nos efeitos observados durante a interação entre neutrófilos e macrófagos infectados. De fato, evidências deste tipo já foram observadas na infecção de camundongos CBA com *L. major* e *L. amazonensis*, nos quais se observa o fenótipo de resistência e suscetibilidade, respectivamente (Veras *et al.*, 2006).

Tsuda e colaboradores publicaram, em 2004, um artigo descrevendo a existência de dois subtipos diferentes de neutrófilos: PMN tipo I (CD49d⁺) e PMN tipo II (CD11b⁺). Utilizando o mesmo modelo animal (camundongos SCID-beige), os autores demonstraram que, a depender do grau de lesões tóxicas causadas nestes camundongos, estes apresentam neutrófilos capazes de serem distinguidos pelo

perfil de citocinas e quimiocinas produzidos, além de apresentarem diferentes marcadores de superfície e receptores do tipo toll distintos. O principal efeito das diferenças apresentadas por estes dois tipos de neutrófilos está na sua capacidade de ativar macrófagos de forma diferenciada, sendo, portanto, capazes de interferir na resposta destas células contra o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Os neutrófilos do tipo I, através da produção de IL-12 e CCL-3 polarizam os macrófagos para um perfil de ativação clássica, capazes de resistir à infecção por MRSA. Neutrófilos do tipo II são produtores de IL-10 e CCL-2 e polarizam os macrófagos para um perfil de ativação alternativa, os quais são suscetíveis às infecções por MRSA. Em nosso trabalho, partimos para a caracterização dos neutrófilos obtidos pelo recrutamento com tioglicolato e com *L. braziliensis*, utilizando para isso a expressão de CD11b e CD49d. Observamos, para nossa surpresa, que os neutrófilos recrutados frente a estes estímulos são do tipo II, pois apresentam marcação positiva para CD11b. Estes resultados foram surpreendentes uma vez que neutrófilos do tipo II levariam à supressão da resposta imune, o que não foi observado aqui. Portanto, para melhor definir qual o tipo de neutrófilo que está atuando na infecção por *L. braziliensis*, será necessário empregar outros parâmetros de análise.

Diante dos nossos resultados e daqueles disponíveis na literatura, fica claro que tanto a linhagem de camundongos utilizada quanto a espécie de *Leishmania* têm importância nos estudos do papel dos neutrófilos. No entanto, sabemos também que o papel dos neutrófilos não é restrito à sua interação com os macrófagos, pois já foi demonstrado que estas células podem estar envolvidas na apresentação cruzada de antígenos (Tvinnereim *et al.*, 2004). Sendo assim, será interessante estudar se, na infecção experimental por *L. braziliensis*, o papel dos neutrófilos na interação com

outras células como células dendríticas e células CD8⁺. Antes disso, porém, será importante esclarecer as moléculas produzidas pelos macrófagos que são responsáveis pela diminuição da infecção frente ao contato com os neutrófilos vivos e mortos.

8 CONCLUSÕES

No modelo de resistência à infecção por *L. braziliensis* nossos dados mostraram que a presença de neutrófilos é importante para o controle parasitário por camundongos BALB/c. Neutrófilos vivos são capazes de reduzir a taxa de infecção bem como o número de amastigotas em macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Da mesma maneira, a co-inoculação de neutrófilos vivos e *L. braziliensis* é capaz de retardar o aparecimento da lesão além de diminuir significativamente o número de parasitas na orelha dos animais infectados. Por outro lado, a depleção de neutrófilos induz uma lesão mais grave em animais infectados com *L. braziliensis* e leva a um aumento na quantidade de parasitas na orelha infectada quando comparados com os camundongos controle.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, L., Borges, V. M., Ribeiro-Gomes, F. L., dos Reis, G. A., Barral, A., Barral-Netto, M., Brodskyn, C. I. 2006. Clearance of apoptotic and necrotic human neutrophils drives appositely the macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. **Infec. Immun.** Enviado para publicação.

Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, Solbach W, Laskay T (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J Immunol** 169, 898-905.

Allen LA (2003) Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. **Microbes Infect** 5, 1329-35.

Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM (1995) Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am J Trop Med Hyg** 53, 256-9.

Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C (1992) Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **J Leukoc Biol** 52, 135-42.

Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL (1998) Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **J Exp Med** 188, 1941-53.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature** 420, 502-7.

Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, Udey MC, Sacks D (2002) CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **J Immunol** 168, 3992-4000.

Beutler B, Cerami A (1988) Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. **Annu Rev Biochem** 57, 505-18.

Bisti S, Konidou G, Boelaert J, Lebastard M, Soteriadou K (2006) The prevention of the growth of *Leishmania major* progeny in BALB/c iron-loaded mice: a process coupled to increased oxidative burst, the amplitude and duration of which depend on initial parasite developmental stage and dose. **Microbes Infect** 8, 1464-72.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P (1994) Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop** 56, 315-25.

Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM (2003) New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **J Clin Microbiol** 41, 540-6.

Chen L, Zhang ZH, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A, Fujiwara H, Sendo F (2005) The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. **Parasitol Int** 54, 109-18.

Childs GE, Lightner LK, McKinney L, Groves MG, Price EE, Hendricks LD (1984) Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Ann Trop Med Parasitol** 78, 25-34.

Courret N, Lang T, Milon G, Antoine JC (2003) Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. **Int J Parasitol** 33, 1373-83.

de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarencio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI (2005) Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun** 73, 5827-34.

de Oliveira, C. I., Barral-Netto, M. 2005. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. **Gazeta Médica da Bahia**. 75(1)Jan-Jun:35-45.

DeKrey GK, Lima HC, Titus RG (1998) Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun** 66, 827-9.

Donnelly KB, Lima HC, Titus RG (1998) Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. **J Parasitol** 84, 97-103.

Fadok VA, Bratton DL, Henson PM (2001) Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. **J Clin Invest** 108, 957-62.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest** 101, 890-8.

Faurschou M, Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect** 5, 1317-27.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde (Disponível em: <http://www.funasa.com.br>).

Grimaldi G, Jr., Soares MJ, Moriearty PL (1984) Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol** 6, 397-408.

Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, *et al.* (1987) Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **J. Infec. Dis.** 156, 73-83.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood** 92, 3007-17.

Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P (2006) Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. **Apoptosis** 11, 1709-26.

Laufs H, Muller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T (2002) Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect Immun** 70, 826-35.

Lee WL, Harrison RE, Grinstein S (2003) Phagocytosis by neutrophils. **Microbes Infect** 5, 1299-306.

Lima GM, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EM, Kiffer MM, Abrahamsohn IA (1998) The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunol Lett** 64, 145-51.

Locksley RM, Scott P (1991) Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Immunol Today** 12, A58-61.

Marsden PD (1986) Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). **Trans R Soc Trop Med Hyg** 80, 859-76.

McMahon-Pratt D, Bennett E, David JR (1982) Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. **J Immunol** 129, 926-7.

Neal RA, Hale C (1983) A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniases. **Parasitology** 87 (Pt 1), 7-13.

OMS - Organização Mundial de Saúde - Leishmaniasis Control (Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acesso em 05/11/06).

Pearson RD, Steigbigel RT (1981) Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol** 127, 1438-43.

Pessoa, S. B., Barreto, M. P. 1944. Leishmaniose tegumentar americana. **Trabalho de Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina**. Universidade de São Paulo. 527p.

Pham CT (2006) Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nat Rev Immunol** 6, 541-50.

Pompeu ML, Freitas LA, Santos ML, Khouri M, Barral-Netto M (1991) Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta Trop** 48, 185-93.

Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, *et al.* (2004) Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J Immunol** 172, 4454-62.

Roos D, van Bruggen R, Meischl C (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes Infect** 5, 1307-15.

Rousseau D, Demartino S, Anjuere F, Ferrua B, Fragaki K, Le Fichoux Y, Kubar J (2001) Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. **Eur Cytokine Netw** 12, 340-7.

Sacks D, Noben-Trauth N (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol** 2, 845-58.

Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature** 407, 784-8.

Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol** 23, 197-223.

Serhan CN, Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol** 6, 1191-7.

Tabbara KS, Peters NC, Afrin F, Mendez S, Bertholet S, Belkaid Y, Sacks DL (2005) Conditions influencing the efficacy of vaccination with live organisms against *Leishmania major* infection. **Infect Immun** 73, 4714-22.

Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, Milon G, Louis JA (2000) An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **J Immunol** 165, 2628-36.

Tateda K, Moore TA, Deng JC, Newstead MW, Zeng X, Matsukawa A, Swanson MS, Yamaguchi K, Standiford TJ (2001) Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of *Legionella pneumophila* pneumonia. **J Immunol** 166, 3355-61.

Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol** 7, 545-55.

Titus RG, Sherry B, Cerami A (1989) Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med** 170, 2097-104.

Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F (2004) Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Immunity** 21, 215-26.

Tvinnereim AR, Hamilton SE, Harty JT (2004) Neutrophil involvement in cross-priming CD8⁺ T cell responses to bacterial antigens. **J Immunol** 173, 1994-2002.

van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J Immunol** 173, 6521-5.

Veras PS, Welby-Borges M, de Santana CD, Nihei J, Cardillo F, de Freitas LA (2006) *Leishmania amazonensis*: participation of regulatory T and B cells in the in vitro priming (PIV) of CBA/J spleen cells susceptible response. **Exp Parasitol** 113, 201-5.

Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ (2000) Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. **J Leukoc Biol** 68, 9-14.