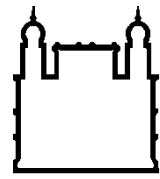




UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA NECROPTOSE ASSOCIADA AO EIXO RIPK1-RIPK3-  
MLKL DURANTE A INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS POR  
*LEISHMANIA INFANTUM***

**LAIANA ARLEGO BARBOSA**

Salvador – Bahia

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**ESTUDO DA NECROPTOSE ASSOCIADA AO EIXO RIPK1-RIPK3-  
MLKL DURANTE A INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS POR  
*LEISHMANIA INFANTUM***

**LAIANA ARLEGO BARBOSA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Deboraci Brito Prates

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia**

**2019**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Barbosa, Laiana Arlego.  
B238e Estudo da necroptose associada ao eixo Ripk1-Ripk3-M1k1 durante a infecção  
de neutrófilos por *Leishmania Infantum*. / Laiana Arlego Barbosa. - 2019.  
55 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Profª Drª. Deboraci Brito Prates, Laboratório de Inflamação e  
Biomarcadores

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia,  
Faculdade de Medicina. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. *Leishmania infantum*. 2. Neutrófilos. 3. Necrose. 4. Infecção. I. Título.

CDU 616.993.161

"ESTUDO DA NECROPTOSE ASSOCIADA AO EIXO RIPK1-RIPK3-MLKL DURANTE A  
INFECÇÃO DE NEUTRÓFILOS POR LEISHMANIA INFANTUM".

Laiana Arlego Barbosa

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 25 de março de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes  
Fullam  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



Dra. Natália Machado Tavares  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



Dra. Deboraci Brito Prates  
Professora  
UFBA

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Bahia e, em particular, ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, pela oportunidade de fazer o curso de mestrado.

Ao Instituto Gonçalo Moniz/ Fundação Oswaldo Cruz - Bahia, que me proporcionou toda a infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) pela bolsa e financiamento, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento.

À Dra. Deboraci Brito Prates, pela sua orientação, sempre presente e dedicada.

À Dra. Valéria pelo seu trabalho e conhecimento científico, e também a todos os colegas "valerianos", sempre dispostos a ajudar, em especial Jéssica Rebouças, pela ajuda e suporte.

Ao apoio científico de Dr. Jonilson Lima, Dr. Marcelo Bozza, Dr. Roque Pacheco de Almeida e Dr. Francis Chan.

À Dra. Nívea Farias Luz por toda sua contribuição e ajuda nesse trabalho.

À Paloma e Rafael, companheiros de experimentos e laboratório, que me ajudaram inúmeras vezes.

Aos profissionais da biblioteca do CPqGM-FIOCRUZ BA, principalmente à Sra. Ana Maria Fiscina pela correção da versão final da dissertação.

À Lucas, por seu apoio incondicional e incentivo para que eu concluísse essa etapa.

Aos meus pais, José Nelson e Jodália, por todo o amor, dedicação e esforço para que eu tenha a melhor educação, sempre guiando meus passos e me inspirando a conquistar meus objetivos. Agradeço também à minha mãe por todos os momentos de dificuldade em que eu tive seu apoio incondicional.

Às minhas avós, Rosália (*in memoriam*) por seu carinho, empolgação e alegria com minhas conquistas, sempre me inspirando com sua força, e Solange por todo seu carinho e amor, e suas orações para que eu fizesse um bom trabalho de conclusão de curso. E a todos os meus familiares que de alguma forma me apoiaram.

A Deus, pela força para superar as dificuldades.

BARBOSA, Laiana Arlego. Estudo da necroptose associada ao eixo Ripk1-Ripk3-Mlkl durante a infecção de neutrófilos por *Leishmania Infantum*. 2019. 55 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* e é considerada um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Apresenta um amplo espectro de formas clínicas, sendo a Leishmaniose Visceral (LV) a mais grave. No Brasil, a LV tem como agente etiológico a *Leishmania infantum*, sendo caracterizada por febre alta, perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e hemorragia nos casos mais graves. Os neutrófilos têm demonstrado ter um papel importante na imunopatogênese da Leishmaniose, sobretudo na LV. Sabe-se que diferentes vias de morte celular podem ser ativadas em neutrófilos, influenciando o curso da infecção por diferentes patógenos. A necroptose, uma via de morte regulada, é canonicamente ativada em ausência de caspase 8, possui características pró-inflamatórias e tem sido descrita no contexto de doenças infecciosas e não infecciosas. **OBJETIVO:** O objetivo geral desse trabalho foi avaliar o efeito da indução da via de morte por necroptose na infecção de neutrófilos humanos e murinos por *L. infantum*. **MATERIAIS e MÉTODOS:** Inicialmente, analisamos os níveis séricos de Lactato Desidrogenase (LDH), enzima característica de dano celular/tecidual, em pacientes com LV, e observamos altos níveis em comparação aos controles saudáveis. Usando o sistema *in vitro* de infecção de neutrófilos humanos e murinos com inibidores de caspase, evidenciamos a ativação da via de morte por necroptose com o envolvimento de RIPK1, RIPK3 e MLKL. Em seguida, foi testado o papel da necroptose na carga parasitária de neutrófilos humanos *in vitro*. **RESULTADO:** O pré-tratamento com inibidores de caspases, seguido da infecção, aumentou os níveis de LDH, a expressão de RIPK3 e MLKL em neutrófilos humanos, ao passo que diminuiu a viabilidade dos parasitas. Esse efeito foi revertido pela Necrosulfonamida (NSA), inibidor farmacológico da MLKL. Em neutrófilos murinos infectados por *L. infantum*, também observamos o envolvimento de moléculas da via da necroptose, RIPK1 e RIPK3 no controle da viabilidade do parasita. Nesses grupos, neutrófilos pré-tratados com os inibidores de caspases apresentaram níveis elevados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e LDH, sugerindo a participação dessas moléculas pró-inflamatórias no controle da infecção. A inibição farmacológica de RIPK1 pela Nec-1 e RIPK3 por GSK'872, reverteu a morte dos parasitas. Por fim, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelou características morfológicas associadas a necroptose em neutrófilos infectados com *L. infantum* quando estes foram pré-tratados com inibidores de caspases, enquanto as células infectadas em presença de inibidores da via de necroptose não apresentaram alterações estruturais. **CONCLUSÃO:** Esses dados sugerem que a inibição de caspase 8 em neutrófilos pode contribuir para controle da infecção por *L. infantum*, possivelmente pelo estímulo de uma resposta inflamatória associada à morte por necroptose.

**Palavras-Chave:** *Leishmania infantum*, Necroptose, Neutrófilo.

BARBOSA, Laiana Arlego. Study of the necroptosis associated to the Ripk1- Ripk3- Mlkl axis during the infection of neutrophils by *Leishmania Infantum*. 2019. 55 f. il. Dissertation (Master in Pathology) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Leishmaniasis is an infectious-parasitic disease caused by the protozoan of the genus *Leishmania* and it is considered a public health problem in Brazil and in the world. It presents a wide spectrum of clinical forms, with Visceral Leishmaniasis (LV) being the most severe. In Brazil, the agent of VL is the species *Leishmania infantum*, and it is characterized by high fever, weight loss, hepatosplenomegaly, anemia, leukopenia and haemorrhage in the most severe cases. Neutrophils have been shown to play an important role in the immunopathogenesis of Leishmaniasis, especially in LV. It is known that different cell death pathways can be activated in infected neutrophils, influencing the course of infection by different pathogens. Necroptosis, a regulated death pathway, is canonically activated in the absence of caspase 8, has proinflammatory characteristics and has been described in the context of infectious and non-infectious diseases. **OBJECTIVE:** The general objective of this work was to evaluate the effect of the necrotic death pathway induction on human and murine neutrophil infection by *L. infantum*. **MATERIALS and METHODS:** Initially, we analyzed serum levels of lactate dehydrogenase (LDH), an enzyme characteristic of cellular / tissue damage, in patients with VL, and observed high levels compared to healthy controls. Using the in vitro system of infection of human and murine neutrophils with caspase inhibitors, we demonstrated the activation of the necroptosis death pathway with the involvement of RIPK1, RIPK3 and MLKL. Next, the role of necroptosis in the parasite load of human neutrophils was tested in vitro. **RESULTS:** Pre-treatment with caspase inhibitors, followed by infection, increased LDH levels, RIPK3 and MLKL expression in human neutrophils, while decreasing the viability of the parasites. This effect was reversed by Necrosulfonamide (NSA), a pharmacological inhibitor of MLKL. In murine neutrophils infected by *L. infantum*, we also observed the involvement of necrotic pathway molecules, RIPK1 and RIPK3 in the control of parasite viability. In these groups, neutrophils pretreated with caspase inhibitors showed high levels of Reactive Oxygen Species (ROS) and LDH, suggesting the participation of these proinflammatory molecules in the control of infection. Pharmacological inhibition of RIPK1 by Nec-1 and RIPK3 by GSK'872 reversed the death of parasites. Finally, transmission electron microscopy (MET) revealed morphological features associated with necroptosis in neutrophils infected with *L. infantum* when these were pre-treated with caspase inhibitors, whereas cells infected in the presence of necroptosis pathway inhibitors showed no structural changes. **CONCLUSION:** These data suggest that inhibition of caspase 8 on neutrophils may contribute to control of *L. infantum* infection, possibly by stimulating an inflammatory response associated with necroptotic death.

**Keywords:** *Leishmania infantum*, Necroptosis, Neutrophil.

## LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LDH	Lactato desidrogenase
LV	Leishmaniose Visceral
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein</i>
NEC-1	Necrostatina-1 (do inglês <i>Necrostatin-1</i> )
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês <i>Neutrophil extracellular traps</i> )
NSA	Necrosulfonamida (do inglês <i>Necrosulfonamide</i> )
PGAM5	<i>Mitochondrial phosphatase phosphoglycerate mutase family member 5</i>
RIPK1	Proteína Cinase de Interação com o Receptor 1 (do inglês <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i> )
RIPK3	Proteína Cinase de Interação com o Receptor 3 (do inglês <i>Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3</i> )
TNF	Fator de Necrose Tumoral



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida da *Leishmania* sp..... 10
- Figura 2.** Vias de sobrevivência ou morte celular apoptótica, na presença de caspase 8, ou morte celular necroptótica, na ausência de caspase 8, após a ativação de receptores de morte da família do TNF..... 21

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1	LEISHMANIOSE: ASPECTOS GERAIS.....	9
1.2	LEISHMANIOSE VISCERAL.....	11
1.3	NEUTRÓFILOS E SUA PARTICIPAÇÃO NA INFECÇÃO POR <i>LEISHMANIA</i> .....	13
1.4	MORTE CELULAR E NECROPTOSE.....	17
2	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	24
2.1	JUSTIFICATIVA .....	24
2.2	HIPÓTESE .....	25
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
4	<b>RESULTADOS</b> .....	27
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	28
6	<b>SUMÁRIO DE RESULTADOS</b> .....	35
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	36
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37
	<b>ANEXO</b> .....	49

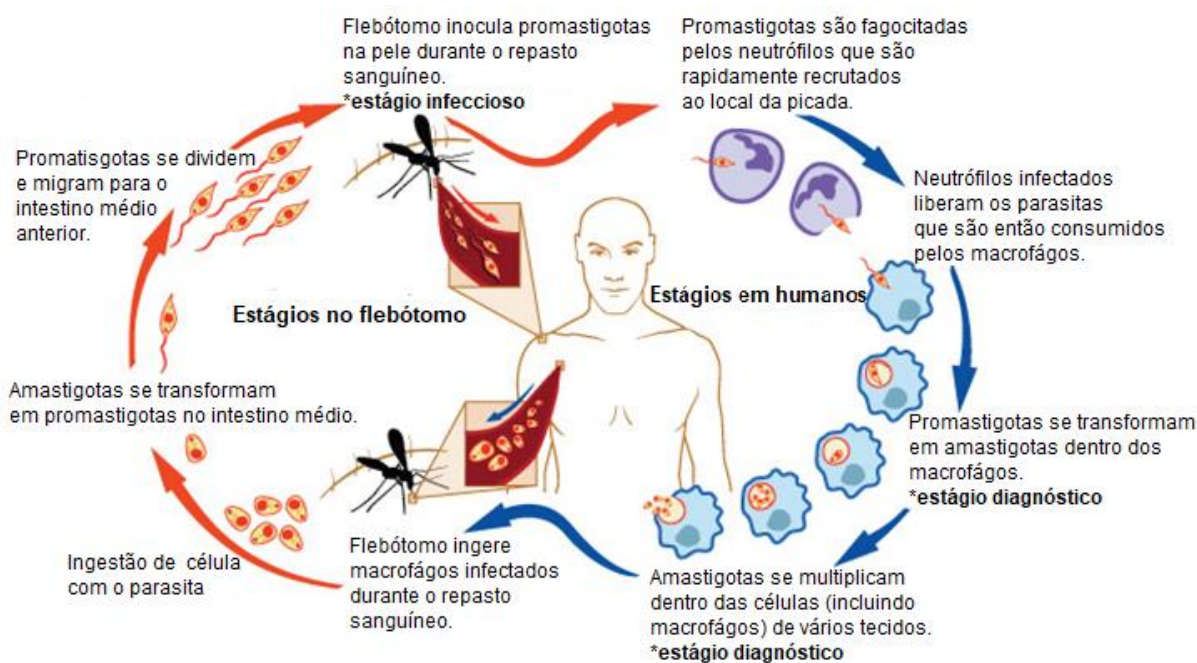
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 LEISHMANIOSE: ASPECTOS GERAIS

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada por diferentes espécies de protozoários da família Tripanossomatidae, ordem Kinetoplastidae e gênero *Leishmania*. É considerada um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Formas de Leishmaniose ocorrem em 88 países, sendo 72 deles em desenvolvimento. Mais de um bilhão de pessoas estão em áreas de risco, e 1,1 – 2 milhões de novos casos ocorrem por ano (WHO, 2017). Ela prevalece em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Mediterrâneo, região sul da Europa, América do Sul e América Central. A Leishmaniose, junto com mais 11 doenças, foi agrupada como doença tropical negligenciada, pois geralmente atinge as populações mais pobres que vivem em países em desenvolvimento com zonas climáticas tropicais. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017), a leishmaniose é uma das sete doenças tropicais mais importantes, entretanto, por estar relacionada à pobreza, não desperta o interesse das indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novas drogas (KUMAR *et al.*, 2017; WHO, 2017).

A *Leishmania* é transmitida pela picada do flebótomo, inseto da ordem Diptera família Psychodidae e gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, a depender da região geográfica. Esse parasito é digenético, tendo o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um invertebrado (na forma promastigota) e um vertebrado (na forma amastigota). A fase promastigota é caracterizada por formas móveis, flageladas e extracelulares, encontradas no intestino do vetor infectado; e a fase amastigota é caracterizada por formas intracelulares obrigatórias, que se encontram nos vacúolos parasitóforos (fagolisossomos) das células fagocitárias do hospedeiro vertebrado (BESTEIRO *et al.*, 2007; SACKS e KAMHAWI, 2001). O flebótomo transmite a *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. As formas promastigotas metacíclicas infectivas, que estavam no aparelho digestório do vetor, são inoculadas junto com componentes da saliva do vetor no “lago sanguíneo” que é formado na derme do hospedeiro. A saliva pode contribuir para o sucesso da infecção e vários trabalhos têm demonstrado esse e outros potenciais farmacológicos da mesma (ARAÚJO-SANTOS *et al.*, 2010; PETERS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2005). Outro importante evento que ocorre durante o repasto é a grande quantidade de células que

são recrutadas para a região da picada, incluindo neutrófilos (PETERS *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2005). Uma vez que esses parasitos são inoculados no hospedeiro vertebrado, os mesmos são englobados por células fagocitárias, tais como neutrófilos e macrófagos, principalmente. Dentro dos macrófagos as promastigotas metacíclicas transformam-se em amastigotas, se dividem e com o rompimento da célula, são liberados no meio extracelular e fagocitados por outros macrófagos. Caso outro flebotomíneo pique o indivíduo infectado, este transmitirá amastigotas da *Leishmania* para o vetor, dando seguimento ao ciclo de vida do parasito (Revisado em ANDRADE *et al.*, 2007) (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida da *Leishmania* sp. (Adaptado de NIAID, 2008)

As diferentes espécies de *Leishmania* podem causar diferentes formas clínicas da doença, variando desde a tegumentar à visceral. A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença de evolução crônica, que produz lesões na pele (Leishmaniose Cutânea, LC), em regiões de mucosa (Leishmaniose Mucosa, LM), de forma localizada (Leishmaniose Cutâneo Localizada, LCL) ou difusa (Leishmaniose Cutâneo Difusa, LCD) (BASANO e CAMARGO, 2004). A LC causa úlceras na pele em regiões expostas à picada do vetor, como braços, pernas e rosto. O número de úlceras pode variar muito. Quando cicatrizam, as lesões normalmente deixam cicatrizes permanentes (WHO, 2018). A LM provoca lesões que atingem as regiões mucosas,

como nariz, boca, garganta e tecidos circundantes (WHO, 2018). A Leishmaniose Visceral (LV) é considerada a forma mais grave da doença. Caracterizada por febre, perda de peso, inchaço do baço e fígado e anemia, pode levar a óbito caso não seja tratada adequadamente.

Há mais de 50 anos, o principal tratamento prescrito para pacientes com Leishmaniose é o uso de Antimoniais Pentavalentes. Os Antimoniais, desde que foram descobertos, são a primeira opção de tratamento a ser utilizada (HERWALDT e BERMAN, 1992). Existem, entretanto, algumas desvantagens no uso destes. São tóxicos, nem sempre são efetivos e devem ser usados por um tempo prolongado, trazendo muitos efeitos colaterais, como artralgia, mialgia, dor abdominal, náuseas, cefaléia, cardiotoxicidade, elevação de enzimas hepáticas e de enzimas pancreáticas. Muitas vezes, ocorre reincidência da doença, precisando de mais uma série do tratamento, aumentando o custo e os efeitos colaterais (ALMEIDA, BRITO e MACHADO, 2005). Como alternativa, no Brasil é utilizada a Anfotericina B em pacientes que não respondem ao Antimonial Pentavalente, porém seu emprego requer hospitalização e sua utilização é limitada pela toxicidade (MARSDEN, 1994). Dessa forma, a busca de conhecimentos a respeito da imunopatogênese da Leishmaniose, bem como de novas alternativas ao seu tratamento revela-se de extrema importância.

## 1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

A Leishmaniose Visceral (LV) ocorre em 65 países do mundo (WERNECK, 2010), tendo impacto onde a população vive em condições de pobreza e são socialmente vulneráveis (WERNECK, 2016). Noventa por cento dos casos de LV ocorrem no Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017). Estima-se entre 50 e 90 mil novos casos a cada ano, com mais de 95% de óbito se não tratada, e aproximadamente de 90-97% de chances de sobrevivência com tratamento no tempo devido (WHO, 2017). A taxa de mortalidade desta doença é estimada em 20.000 a 40.000 óbitos por ano (SPIEGEL *et al.*, 2016). No Brasil, a LV tem uma ampla distribuição, alta incidência e alto índice de mortalidade, principalmente quando associada à má nutrição e infecções concomitantes (GONTIJO *et al.*, 2004). No Brasil, esta doença tem como agente etiológico a espécie *Leishmania infantum* e como vetor o flebótomo *Lutzomyia longipalpis*.

A maneira como a LV se manifesta e evolui depende do indivíduo, variando entre um amplo espectro de manifestações clínicas: de quadros assintomáticos a quadros clínicos patológicos clássicos da doença (GARDINASSI *et al.*, 2017). A LV clássica sintomática geralmente tem evolução gradual e começa com adinamia (fraqueza muscular), perda de apetite, leve aumento do baço (esplenomegalia) e febre alta (às vezes gradual e às vezes abruptas). Também ocorre aumento do fígado (hepatomegalia), mas normalmente em escala menor que o do baço. O tamanho do baço e do fígado continuam aumentando caso não seja feito o tratamento. Entretanto, ao contrário de outras doenças nas quais ocorre aumento de baço e fígado, se o tratamento adequado for feito, ocorre uma notável redução desses órgãos. Ocorre também a imunodepressão, destacando uma diminuição do número de neutrófilos no sangue (neutropenia) como uma das principais características laboratoriais de pacientes com LV (QUEIROZ e CAVALCANTI, 2010). No decorrer da doença, observa-se anemia acentuada e, algumas vezes, aparece tosse seca e sinais de bronquite. A falta de apetite tende a levar a um grave quadro de desnutrição. Casos de hemorragia são relatados caracterizando maior gravidade da doença. (ABBAS *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013). Apesar da imunodepressão que ocorre na LV, já foi observado que ela possui um perfil pró-inflamatório que constitui fator clínico chave na fisiopatologia da doença, que tem sido alvo de muitos estudos. Pacientes com forma grave de LV apresentam altos níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas pró inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IP-10, o que é característico de uma resposta inflamatória sistêmica e aguda (GOTO e PRIANTI, 2009; NYLE, 2007). Recentemente, foi demonstrado pelo nosso grupo que a LV ativa é caracterizada por um desequilíbrio inflamatório, com uma assinatura molecular marcada por altos níveis de PGF2a, LTB4, RvD1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, IL-10 e IL-12p70 (ARAÚJO-SANTOS *et al.*, 2017). Esse conjunto de dados reforça a necessidade de uma maior compreensão a respeito do perfil dessa doença, inclusive no que diz respeito às vias de morte celular em neutrófilos. De fato, sabe-se que a neutropenia é uma característica laboratorial da LV (QUEIROZ e CAVALCANTI, 2010) e essa neutropenia pode estar associada ao aumento de infecções secundárias (Badaro *et al.*, 1994), além disso, já foi visto que a neutropenia induzida em camundongos resulta na replicação descontrolada de parasitas após infecções por *Leishmania mexicana* (HURRELL *et al.*, 2015).

O diagnóstico clínico da LV é feito a partir de análises do parasito retirado por punção do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos do paciente. Existem também métodos menos invasivos, como o diagnóstico imunológico. Uma das características da LV é uma estimulação policlonal de linfócitos B, que leva a uma grande produção de anticorpos e também a hipergamaglobulinemia; isso facilita o diagnóstico por meio de testes sorológicos (GONTIJO *et al.*, 2004).

### 1.3 NEUTRÓFILOS E SUA PARTICIPAÇÃO NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*

Neutrófilos, também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares por possuírem o núcleo segmentado em 3 a 5 lóbulos, são os leucócitos encontrados em maior quantidade no sangue (1800 a 7700 células/microlitro), e derivados de células tronco mielóides na medula óssea (FOX *et al.*, 2010). Os neutrófilos são classificados como granulócitos, pois seu citoplasma contém um arsenal de grânulos, em sua maioria preenchidos por enzimas importantes na defesa contra os patógenos (ABBAS *et al.*, 2011).

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa celular da resposta imune inata. A migração dessas células para o local de infecção é orquestrada por diferentes estímulos quimiotáticos. No contexto da infecção, essas células fagocitam os microorganismos que, ao serem englobados, são expostos à várias enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas que se encontram nos seus grânulos. Além disso, o conteúdo dos grânulos também pode ser liberado no ambiente extracelular após a ativação da célula (ARNHOLD, 2004). Outro mecanismo de defesa dos neutrófilos é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem capacidade oxidante e de alta reatividade com a membrana celular e parede bacteriana (KLEBANOFF, 2005; NAUSEEF, 2007). Assim, após fagocitar microorganismo, ocorre uma alta produção de EROs como consequência à ativação de NADPH oxidase. Essa enzima catalisa a formação de ânions superóxido, a partir da redução de oxigênio molecular. Esses ânions superóxidos podem formar o peróxido de hidrogênio que pode ser convertido em fortes antissépticos e outras espécies reativas de oxigênio (KENNEDY e DELEO, 2009; KLEBANOFF, 2005; QUINN *et al.*, 2006).

Além dos mecanismos de defesa descritas no parágrafo anterior, os neutrófilos liberam armadilhas extracelulares neutrofilicas (*Neutrophil Extracellular Traps* -

NETs). As NETs são constituídas por “fibras” de cromatina, tendo deste modo o DNA e as histonas como seus principais componentes, correspondendo três a cinco vezes o volume da cromatina condensada. Várias proteínas com atividade bactericida capazes de destruir fatores de virulência aderem às NETs, evidenciando seu papel em algumas infecções (DELGADO-RIZO *et al.*, 2017; GARDINASSI *et al.*, 2017). De fato, a morte por NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) já foi descrita na infecção de neutrófilos por *Leishmania amazonensis* (GUIMARAES-COSTA *et al.*, 2009).

No contexto da infecção pela *Leishmania*, os neutrófilos também apresentam importância, embora as células hospedeiras preferenciais para esse parasita sejam os macrófagos. Um crescente número de estudos vem mostrando o papel que os neutrófilos desempenham no controle da infecção pela *Leishmania*. Essas células fagocitam esses parasitos e produzem citocinas e mediadores inflamatórios. Além disso, podem também interagir com macrófagos promovendo a infecção (AFONSO *et al.*, 2008; APPELBERG, 2007; CHARMOY *et al.*, 2010; DABOUL, 2010; FALCÃO *et al.*, 2015; LAUFS *et al.*, 2002; PEARSON e STEIGBIGEL, 1981; PETERS e SACKS, 2009; PRATES *et al.*, 2011; QUINTELA-CARVALHO *et al.*, 2017; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2005; TAVARES *et al.*, 2016; TAVARES *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2018; THALHOFER *et al.*, 2011; YIZENGAW *et al.*, 2016). Embora um maior número de trabalhos evidencie a atuação principal dos neutrófilos nos momentos iniciais da infecção pela *Leishmania*, por serem as primeiras células recrutadas ao local, dados mostram o seu papel também em fases mais tardias da doença. Já foram encontrados neutrófilos em lesões de pacientes com LC, eliminando a *Leishmania* através da fagocitose dos amastigotas nos estágios posteriores do processo da doença (DABOUL, 2010).

O papel do neutrófilo na infecção por *Leishmania* spp., no entanto, é controverso, podendo ser protetor ou deletério para o parasito, dependendo da espécie e do hospedeiro vertebrado (GUEIRARD *et al.*, 2008; GUIMARAES, 2009; MCFARLANE *et al.*, 2008; ROUSSEAU *et al.*, 2001; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Neutrófilos já foram relatados no contexto da Leishmaniose como prejudicial para o hospedeiro, interferindo no desenvolvimento da resposta imune e no controle da carga parasitária, mas também já foi relatado como benéfico contribuindo para a morte destes parasitos (HURRELL *et al.*, 2016). Após o neutrófilo fagocitar a *Leishmania*, a forma como ele irá interagir com o parasito nas primeiras horas de infecção, e também



a via de morte celular que pode ser deflagrada, é decisiva para o curso que a infecção irá tomar.

Estudos realizados com neutrófilos humanos mostraram que essas células matam a *Leishmania donovani* por mecanismos oxidativos (PEARSON e STEIGBIGEL, 1981). Já foi evidenciado também a capacidade leishmanicida de neutrófilos humanos que fagocitaram a *L. major*, após opsonização (LAUFS *et al.*, 2002). Nesse estudo foi demonstrado que neutrófilos possuem mecanismos para a absorção de *Leishmania* dependente e independente de opsonina / complemento. Na presença de soro humano fresco, cerca de 50% dos neutrófilos fagocitaram os parasitas em 10 minutos e a captação do parasita levou à ativação de neutrófilos, resultando na morte da maioria dos parasitas ingeridos (LAUFS *et al.*, 2002). Em 2008, um trabalho realizado por Afonso e colaboradores (2008), mostrou que a interação com neutrófilos apoptóticos, mas não com neutrófilos necróticos, aumenta a carga de parasitos em macrófagos humanos infectados com *Leishmania amazonensis* (AFONSO *et al.*, 2008). A fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos infectados por *Leishmania* aumentou a carga parasitária devido um mecanismo dependente de TGF- $\beta$ 1 e PGE2, reforçando que um microambiente anti-inflamatório favorece o crescimento do parasita. Por outro lado, macrófagos infectados que englobaram neutrófilos necróticos foram capazes de matar a *L. amazonensis* por mecanismos pró-inflamatórios dependentes de TNF- $\alpha$  e elastase neutrofílica (AFONSO *et al.*, 2008).

Ainda em neutrófilos humanos, trabalhos evidenciam o papel de receptores do tipo Toll (TLR) na infecção por *Leishmania*. Tavares e colaboradores (2014) mostraram que *L. amazonensis* pode ser reconhecida pelo TLR2, estimulando a ativação de neutrófilos. Esta ativação conduz então à degranulação de neutrófilos através de um mecanismo autócrino/parácrino dependente de LTB4. A ativação de NF $\kappa$ B também está envolvida na produção de LTB4, e seus efeitos, via receptor BLT1, contribuem para a morte do parasita (TAVARES *et al.*, 2014). Um estudo dos mesmos autores, em 2016, sugeriu que a degranulação de neutrófilos induzida pela proteína de matriz extracelular fibronectina, induz a produção de LTB4 e TNF por macrófagos infectados, levando ao controle da infecção por *Leishmania* (TAVARES *et al.*, 2016). Esses dados sugerem a importância de mecanismos pró-inflamatórios na infecção por *Leishmania* em neutrófilos humanos. Conceição e colaboradores (2016) tentaram caracterizar neutrófilos de pacientes com LC infectados com *L. braziliensis* e

mostraram que os neutrófilos dos pacientes apresentavam um perfil mais inflamatório, exibindo níveis mais elevados de EROs e produção de quimiocinas, comparados aos neutrófilos de controles saudáveis (CONCEIÇÃO *et al.*, 2016). Concordando com esse resultando de um perfil mais inflamatório de neutrófilos, foi demonstrado pelo nosso grupo, morte celular associada ao estresse oxidativo em neutrófilos humanos, porém infectados por *L. infantum* (QUINTELA-CARVALHO *et al.*, 2017).

No contexto da Leishmaniose Visceral, um estudo recente avaliou o estado de ativação e funções efetoras de neutrófilos em pacientes com LV ativa e após o tratamento bem-sucedido (YIZENGAW *et al.*, 2016). Eles demonstraram que os neutrófilos são altamente ativados e degranulam no plasma dos pacientes, uma vez que nestes foram detectados altos níveis de arginase, mieloperoxidase e elastase neutrofílica. Entretanto, apesar do perfil ativado e maduro dos neutrófilos, foi observado que uma grande parte destes, presentes no plasma dos pacientes, são imaturos. Nesse trabalho, foram analisadas as funções efetoras dos neutrófilos que são essenciais para a depuração de patógenos e evidenciou-se que apesar de uma alta atividade de parte dos neutrófilos, mostrada pela liberação de grânulos, e capacidade de fagocitar parasitas de *Leishmania*, estes têm sua capacidade reduzida de liberar as NETs, de produzir espécies reativas de oxigênio e fagocitar partículas bacterianas. Dessa forma, eles concluíram que o comprometimento de algumas funções efetoras, o aumento da ativação dos neutrófilos maduros e a imaturidade de grande parte dos neutrófilos desempenham um papel na patogênese da LV (YIZENGAW *et al.*, 2016).

Sharma e colaboradores (2016) encontraram um subconjunto de neutrófilos expressando marcadores de Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) em pacientes com LV. Eles encontraram uma população expandida de neutrófilos que expressam HLA-DR (MHC II), e as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 em pacientes com LV. Essa população de neutrófilos diminui após o tratamento com sucesso. Além disso, o plasma de pacientes com LV aguda foi capaz de induzir uma expressão similar de altos níveis de HLA-DR em neutrófilos de indivíduos saudáveis. Os neutrófilos HLA-DR + de indivíduos com LV não estimularam a proliferação de células T, mas expressaram maior número de ligante de morte celular programada 1 (PDL1 - Programmed death-ligand 1) do que outros neutrófilos, e os linfócitos dos mesmos indivíduos expressaram altos níveis de morte celular programada 1 (PD1)

(SHARMA *et al.*, 2016). Esses resultados reforçam a importância do papel do neutrófilo na LV humana.

Diferentes vias de morte celular têm sido descritas no contexto da infecção de neutrófilos por *Leishmania*. Neutrófilos apoptóticos podem servir de carreadores do parasita para os macrófagos (PETERS *et al.*, 2009; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Neutrófilos infectados por *L. major* e apoptóticos podem ser fagocitados por macrófagos, permitindo a entrada dos parasitos nessas células de forma silenciosa (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Este trabalho gerou a hipótese denominada “Cavalo de troia”. Por outro lado, os parasitos podem também ser liberados dos neutrófilos apoptóticos e, posteriormente fagocitados por macrófagos, em um microambiente anti-inflamatório decorrente da morte por apoptose, favorecendo a infecção (PETERS *et al.*, 2009). A apoptose também foi descrita como uma via de morte celular em neutrófilos infectados por *L. braziliensis* (FALCÃO *et al.*, 2015), *L. major* (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012) e *L. infantum* (PRATES *et al.*, 2011). Neste último, foi demonstrado que a *L. infantum* induz apoptose de neutrófilos favorecendo a infecção (PRATES *et al.*, 2011). Por outro lado, *L. braziliensis* induz o recrutamento de neutrófilos *in vivo* e culturas de neutrófilos de camundongos infectados com *L. braziliensis* induz a expressão de moléculas de adesão, produção de EROs e secreção de elastase e TNF- $\alpha$ , dois importantes mediadores inflamatórios, contribuindo para a morte do parasita (FALCÃO *et al.*, 2015). Todos esses trabalhos são importantes para melhor compreensão das vias de morte estudadas em neutrófilos infectados por *Leishmania*.

#### 1.4 MORTE CELULAR E NECROPTOSE

A morte celular é uma parte essencial da homeostase em organismos multicelulares, como uma forma de remover células danificadas, infectadas ou degeneradas, e é regulada pelo sistema imune (OPFERMAN, 2008; VAUX e KORSMEYER, 1999). Segundo o Comitê Internacional de Nomenclatura em Morte Celular, a morte celular pode ser definida como a degeneração irreversível das funções vitais da célula culminando em sua perda de integridade (GALLUZZI *et al.* 2018). De acordo com os mecanismos como estas ocorrem, os diversos tipos de morte celular podem ser classificados como mortes acidentais ou reguladas, sendo estas últimas as que dependem de uma maquinaria molecular, podendo ser moduladas e

passíveis de intervenções genéticas ou farmacológicas. A morte celular regulada abrange o subgrupo de morte celular programada bastante conhecida chamada apoptose e outros diferentes tipos de morte não programada, tais como: ferroptose (iniciada por perturbações oxidativas do microambiente intracelular que está sob controle constitutivo por GPX4 e pode ser inibida por quelantes de ferro e antioxidantes lipofílicos), piroptose (depende criticamente da formação de poros na membrana plasmática por membros da família das proteínas de gasderminas, muitas vezes como consequência da ativação inflamatória da caspase) e necroptose (GALLUZZI *et al.*, 2018). Classicamente falando, quando se considera uma classificação baseada em critérios morfológicos (e não os moleculares) reconhece-se as mortes por apoptose, por autofagia e a necrose (GALLUZZI *et al.*, 2015, 2012; GALLUZZI *et al.*, 2018).

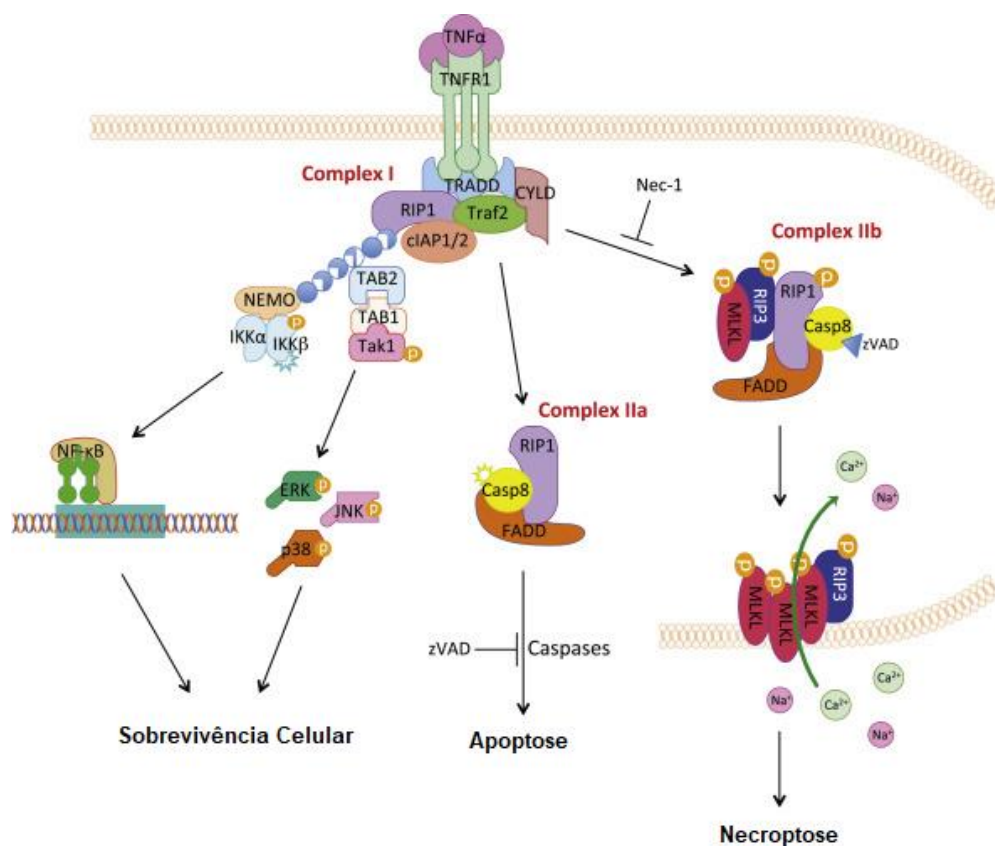
A apoptose é uma morte silenciosa com características anti-inflamatórias que ocorre geralmente na presença de caspases. Existem duas vias apoptóticas principais, a via extrínseca (de receptores de morte) e a intrínseca (mitocondrial). Além disso, há uma terceira via, a via de perforina / granzima, que envolve a citotoxicidade mediada por células T e a morte da célula dependente de perforina-granzima. Cada caminho ativa sua própria caspase iniciadora (8 no caso da via extrínseca, 9 no caso da via intrínseca, 10 no caso da via de perforina / granzima) que, por sua vez, ativará a caspase executora 3 (ELMORE, 2007). Suas principais características morfológicas são a manutenção da integridade celular, protrusões de membrana, picnose, clivagem internucleossomal do DNA e redução do tamanho nuclear e da célula. Tardiamente pode ocorrer a formação de corpos apoptóticos (WU *et al.*, 2012). A autofagia, do ponto de vista de morte celular, caracteriza-se pela vacuolização extensiva do citoplasma e degradação do conteúdo citoplasmático, é um mecanismo em resposta ao estresse que resulta na sobrevivência dos tecidos. A autofagia pode acontecer de forma descontrolada, resultando em condições patológicas (GALLUZZI *et al.*, 2012; GALLUZZI *et al.*, 2011). Molecularmente, a autofagia é regulada pelos produtos dos genes Atg (DWIVEDI e AHNN, 2009), e envolve as moléculas PI3K III (fosfatidilinositol 3-cinase de classe III) também chamada Vps34, beclina 1 (mAtg6), p150 (subunidade reguladora da Vps34) (YAN e BACKER, 2007) e mAtg14L, entre outras (MURROW e DEBNATH, 2014). A necrose é caracterizada morfológicamente por perda da integridade da membrana, intumescimento celular, disfunção da mitocôndria e liberação do conteúdo celular. A necrose foi durante muito tempo descrita como uma

morte acidental e não regulada. Hoje sabe-se que ela pode ocorrer de forma regulada, consistindo assim na via de morte chamada necroptose (CHAN *et al.*, 2014; KEARNEY e MARTIN, 2017; MOCARSKI, GU e KAISER, 2015; MORIWAKI e CHAN, 2013; PASPARAKIS e VANDENABEELE, 2015; PFEIFFER e MORLEY, 2014).

O termo necroptose foi originalmente descrito em 2005 e define uma via de morte regulada com características pró-inflamatórias, que pode ser ativada por diversos receptores e estímulos. O modelo mais estudado dessa via é o do receptor TNFR1, um receptor de morte que é ativado pelo ligante TNF- $\alpha$  (DEGTEREV *et al.*, 2005), conforme figura 2. Outros exemplos de receptores que podem, a depender das circunstâncias do ambiente intracelular, estar envolvidos na necroptose são: FS7-associado ao antígeno de superfície celular (Fas) (KRAMMER, 2000), os receptores 1 e 2 de ligantes indutores de apoptose relacionados ao TNF (TRAILR1 e TRAILR2) (PAN, 1997a, 1997b) e os receptores do tipo Toll 3 e 4 (TLR3 e TLR4) (KAISER *et al.*, 2013). Estresse químico também já foi mostrado como gatilho para necroptose em seis linhagens celulares: células HT29; células T Jukart leucêmicas; células CCRF-CEM; células humanas monocíticas leucêmicas U937; células de camundongos com fibrosarcoma L929; e fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) (HE *et al.*, 2009).

Estudos recentes descrevem que a morte por necroptose ocorre pela formação do complexo proteico contendo RIPK1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1), RIPK3 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3) e MLKL (Mixed Lineage Kinase Domain-Like), chamado necrossomo (REMIJSEN *et al.*, 2014). A ligação do TNF- $\alpha$  à região extracelular do TNFR1 causa modificações alostéricas na região intracelular deste receptor, e ocorre a liberação do silenciador de domínios de morte. Então, forma-se o Complexo I, que contém um domínio de morte associado ao receptor do TNF- $\alpha$  (TRADD), uma proteína de interação com o receptor 1 (RIPK1), o domínio de morte associado ao Fas (FADD) e várias ubiquitina ligases E3. Após a formação do Complexo I, a via que será ativada (sobrevivência, apoptose ou necroptose) depende de eventos intracelulares (ANDERA, 2009) (Figura 2). Quando a RIPK1 é recrutada para o complexo I ela pode ser ubiquitinada pela c-IAP (proteínas inibidoras de apoptose), o que está associado com a via de sobrevivência celular que resulta na ativação do NF- $\kappa$ B. Por outro lado, na ausência de c-IAP a RIPK1 não é ubiquitinada, o que pode promover a translocação dessa quinase para um complexo citoplasmático secundário, o Complexo II, formado pelo domínio de morte FADD, a

caspace-8 e cFLIP. O Complexo II pode ativar tanto as vias de sinalização que levam a apoptose ou a necroptose. Quando a caspace 8 está ativada, essa via é levada para a apoptose por clivagem de RIPK1 e RIPK3 (SILKE *et al.*, 2015). Na ausência de caspace 8, que pode ocorrer por fatores genéticos ou farmacológicos (GALLUZZI *et al.*, 2014), essa via é direcionada à necroptose. Nesse caso, a RIPK1 interage com a RIPK3, formando um complexo essencial para o recrutamento e a fosforilação da MLKL. Ativada, a MLKL desestabiliza direta ou indiretamente a integridade da membrana levando ao aumento do volume celular, à ruptura da membrana e à liberação de Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs - *Damage-associated molecular patterns*) (SUN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014; XIA *et al.*, 2016). O exato mecanismo pelo qual a MLKL induz a ruptura de membrana ainda é controverso. Estudos indicam que esta pode ocorrer devido à diferença de concentração de sódio (Na<sup>+</sup>) entre os meios intra e extracelular. Após a formação de poros na membrana, a tendência é o influxo de Na<sup>+</sup> na célula e esse aumento de osmolalidade causada pelo excesso de Na<sup>+</sup> e outros cátions pode ser responsável pela ruptura da membrana plasmática (CHEN *et al.*, 2016; XIA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017) (Figura 2). A via necroptótica pode ser inibida pela caspace-8 ou por compostos como a Necrostatina 1 (Nec-1, que inibe a RIPK1), GSK'872 (inibidor de RIPK3) e Necrosulfonamida (NSA, inibidor de MLKL) (WU *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Vias de sobrevivência ou morte celular apoptótica, na presença de caspase 8, ou morte celular necroptótica, na ausência de caspase 8, após a ativação de receptores de morte da família do TNF (Adaptada de Zhou e Yuan, 2014).

A necroptose tem sido estudada em diversas condições patológicas (ZHOU e YUAN, 2014), tais como doenças neurodegenerativas (YANG *et al.*, 2017), síndrome da resposta inflamatória sistêmica letal (DUPREZ *et al.*, 2011), vasculites associadas ao anticorpo anticitoplasma de neutrófilo (Anca) (SCHREIBER *et al.*, 2017), aterosclerose (LEEPER, 2016), doenças inflamatórias imunomediadas (como doenças inflamatórias intestinais e artrite reumatoide) (LEE *et al.*, 2017; BARBÉ, 2015), infarto do miocárdio (LIM *et al.*, 2007; LUEDDE *et al.*, 2014; OERLEMANS *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2007), acidente vascular cerebral (DEGTEREV *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2010), distúrbios de retina (DONG *et al.*, 2012; SATO *et al.*, 2013; TRICHONAS *et al.*, 2010), pancreatite aguda (HE *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2013) e doenças crônicas do fígado (LINKERMANN *et al.*, 2013). A necroptose também tem se mostrado importante na defesa do hospedeiro, contribuindo para a imunidade inata, matando células infectadas por patógenos. Ela vem sendo estudada sobretudo no contexto de imunidade a várias doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias e parasitos (BELIZÁRIO *et al.*, 2015; FARIAS-LUZ *et al.*, 2016; MORENO-GONZALEZ,

VANDENABEELE e KRYSKO, 2016). Recentemente, estudos têm sido feitos utilizando a inibição da necroptose como forma de tratamento para algumas doenças como, lesões renais e doença de Niemann-Pick (COUGNOUX *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2018).

Na necroptose ocorre perda da integridade de membrana, fazendo com que moléculas endógenas (DAMPs), que são potentes pró-inflamatórias, sejam liberados (KONO e ROCK, 2008). DAMPs são liberados de células mortas devido a danos, trauma, isquemia e necrose induzida por infecção. Elas são derivadas de células hospedeiras e colaboram para iniciar uma resposta imune (CHOI e KLESSIG, 2016; GALLUZZI *et al.*, 2015). Exemplos de DAMP's associados a via de morte por necroptose são a Lactato desidrogenase (LDH) e as EROs. A LDH é uma enzima que se encontra no citosol da célula, sendo liberada para o meio extracelular quando há perda de integridade da membrana plasmática, sendo dessa forma, um bom marcador de dano celular e morte pró inflamatória (CHTOUROU *et al.*, 2015; TAKEMOTO *et al.*, 2014). Na morte celular por necroptose, também ocorre produção de EROs, que possui capacidade microbicida, devido a sua ação oxidante e sua alta reatividade com membrana celular e parede bacteriana (NATHAN, 2006). Por outro lado, EROs também contribuem para a execução da necroptose, promovendo a peroxidação de lipídios, proteínas e DNA, ou como segundos mensageiros nas vias de sinalização dos receptores de morte (CHALLA e CHAN, 2010; VANDENABEELE *et al.*, 2010).

Apenas recentemente, a necroptose demonstrou ter importância no contexto da infecção de macrófagos humanos e murinos por *Leishmania*. RIPK1 e PGAM5 (Mitochondrial phosphatase phosphoglycerate mutase family member 5), estão envolvidos no controle da replicação da *Leishmania* dentro de macrófagos, através de mecanismos distintos. Verificou-se que a inibição da atividade da RIPK1 em macrófagos aumentou a replicação do parasito. Além disso, PGAM5, um efetor downstream da RIPK1, também foi necessário para a inibição da replicação de *Leishmania*. Estes resultados revelaram que RIPK1 e PGAM5 funcionam independentemente exercendo um controle ótimo da replicação de *Leishmania* em macrófagos (FARIAS-LUZ *et al.*, 2016). Neste mesmo estudo, curiosamente foi observado que camundongos Knockout (KO) para PGAM e Knockdown (KN) para RIPK1 e infectados com *Leishmania amazonensis* apresentaram inflamação tecidual marcada pela infiltração de neutrófilos, mostrando um importante papel dessas células nesse contexto. Um trabalho ainda mais recente utilizando macrófagos mostrou que



*L. braziliensis* desativa tanto a expressão de RIPK3 quanto de MLKL e que essas moléculas são importantes para o controle da replicação intracelular desse parasito (FARIAS-LUZ *et al.*, 2018). Entretanto, a necroptose de neutrófilos na infecção por *Leishmania* ainda não foi explorado. Por outro lado, a literatura mostra que neutrófilos podem sofrer necroptose (JIAO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016), embora em modelos que não envolvem infecção. Wang e colaboradores (2016) descreveram a necroptose em neutrófilos humanos expostos a GM-CSF, seguido pela ligação de receptores de adesão como CD44, CD11b, CD18 ou CD15. A necroptose desses neutrófilos foi dependente de RIPK3 e MLKL e envolveu a ativação de p38 MAPK e PI3K, que finalmente levaram a produção de altos níveis de oxigênio reativo (EROs). Todas essas etapas foram necessárias para a necroptose ocorrer. Além disso, eles mostraram que MLKL sofre fosforilação em neutrófilos *in vivo*, sob condições inflamatórias (WANG *et al.*, 2016). Como nosso grupo já demonstrou que a necroptose exerce um papel importante em macrófagos infectados por *Leishmania*, e sabe-se que neutrófilos podem sofrer necroptose em diversos contextos não necessariamente infecciosos, além de possuírem também um papel importante na infecção por *Leishmania*, torna-se relevante aprofundar o conhecimento a respeito dos efeitos da necroptose em neutrófilos durante a infecção por *Leishmania*.

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

### 2.1 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença grave que pode levar a óbito. Ocorre principalmente em regiões mais pobres, sendo considerada uma doença negligenciada. Ela representa um problema de saúde pública que atinge muitos países no mundo, incluindo o Brasil. Os tratamentos para a LV utilizados atualmente são extremamente tóxicos, resultando muitas vezes em efeitos colaterais. Comumente ocorre reincidência da doença, sendo necessário ciclos de tratamento (GEORGIADOU *et al.*, 2015).

Dados do nosso grupo mostraram que *L. infantum*, espécie causadora da LV, é capaz de ativar a via de morte por apoptose em neutrófilos murinos, sobretudo em presença da saliva do vetor, contribuindo para o aumento da carga parasitária (PRATES *et al.*, 2011). Nesse mesmo trabalho, observou-se que a inibição de caspases em neutrófilos alterou o padrão de infecção por mecanismos ainda desconhecidos. Além disso, mais recentemente nosso grupo mostrou que macrófagos infectados por *L. amazonensis* ativam vias dependentes de RIPK1 e PGAM5, moléculas já descritas na via de morte por necroptose também. Nesse estudo foi encontrado que camundongos *Knockout* (KO) para PGAM5 e *Knockdown* (KN) para RIPK1 infectados por *L. amazonensis* apresentaram infecção tecidual marcada pela infiltração de neutrófilos (FARIAS-LUZ *et al.*, 2016). Sugerindo que neutrófilos e necroptose podem estar relacionados no contexto de infecção por *Leishmania*.

Além disso, a neutropenia já foi observada em pacientes com LV, sendo considerada um fator de risco (QUEIROZ e CAVALCANTI, 2010), indicando que os neutrófilos podem estar envolvidos em diferentes estados da infecção por *Leishmania*. Dessa forma, torna-se importante investigar a ocorrência de necroptose em neutrófilos infectados por *L. infantum* e suas consequências na infecção.

## 2.2 HIPÓTESE

A nossa hipótese é de que a indução da necroptose em neutrófilos infectados por *Leishmania infantum*, leva ao aumento da inflamação e redução da carga parasitária nestas células.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar o efeito da indução da via de morte por necroptose na infecção de neutrófilos humanos e murinos por *L. infantum*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o efeito dos inibidores de caspases na atividade inflamatória de neutrófilos infectados por *L. infantum*;
2. Avaliar o papel dos inibidores de caspases na necroptose de neutrófilos infectados por *L. infantum*;
3. Avaliar o efeito da necroptose na infecção de neutrófilos por *L. infantum*;
4. Investigar o envolvimento do eixo RIPK1-RIPK3-MLKL deflagrado pela indução da necroptose em neutrófilos infectados por *L. infantum*.

#### 4. RESULTADOS

O Artigo “**RIPK1-RIPK3-MLKL-Associated Necroptosis Drives *Leishmania infantum* Killing in Neutrophils**” dos seguintes autores: Laiana A. Barbosa; Paloma P. Fiuza; Leticia J. Borges; Fellipe A. Rolim; Mayara B. Andrade; Nivea F. Luz; Grazielle Quintela-Carvalho; Jonilson B. Lima; Roque P. Almeida; Francis K. Chan; Marcelo T. Bozza; Valeria M. Borges e Deboraci B. Prates, foi publicado na revista *Frontiers in Immunology* no ano de 2018. O artigo mostra por meio de experimentos utilizando neutrófilos humanos e murinos que a indução da necroptose nessas células contribui para a morte de parasitos de *Leishmania infantum*, de acordo com os objetivos dessa dissertação.



# RIPK1–RIPK3–MLKL-Associated Necroptosis Drives *Leishmania infantum* Killing in Neutrophils

Laiana A. Barbosa<sup>1†</sup>, Paloma P. Fiuza<sup>1†</sup>, Leticia J. Borges<sup>1</sup>, Fellipe A. Rolim<sup>1</sup>, Mayara B. Andrade<sup>1</sup>, Nivea F. Luz<sup>2</sup>, Grazielle Quintela-Carvalho<sup>1,2,3</sup>, Jonilson B. Lima<sup>4</sup>, Roque P. Almeida<sup>5</sup>, Francis K. Chan<sup>6</sup>, Marcelo T. Bozza<sup>7</sup>, Valeria M. Borges<sup>1,2\*†</sup> and Deboraci B. Prates<sup>2,8\*†</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, <sup>2</sup> Laboratório de Inflamação e Biomarcadores, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil, <sup>3</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, Santa Inês, Brazil, <sup>4</sup> Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Oeste da Bahia, Barreiras, Brazil, <sup>5</sup> Departamento de Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Brazil, <sup>6</sup> Department of Pathology, Immunology and Microbiology Program, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, United States, <sup>7</sup> Departamento de Imunologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>8</sup> Departamento de Biomorfologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Celio Geraldo Freire-de-Lima,  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

### Reviewed by:

Juliana Dutra Barbosa Da Rocha,  
University of Toronto, Canada  
Núria Gironès,  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Spain

### \*Correspondence:

Valeria M. Borges  
vborges@bahia.fiocruz.br;  
Deboraci B. Prates  
debyprates@gmail.com

<sup>†</sup>These authors have contributed equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted to Microbial Immunology, a section of the journal Frontiers in Immunology

**Received:** 19 April 2018

**Accepted:** 24 July 2018

**Published:** 14 August 2018

### Citation:

Barbosa LA, Fiuza PP, Borges LJ, Rolim FA, Andrade MB, Luz NF, Quintela-Carvalho G, Lima JB, Almeida RP, Chan FK, Bozza MT, Borges VM and Prates DB (2018) RIPK1–RIPK3–MLKL-Associated Necroptosis Drives *Leishmania infantum* Killing in Neutrophils. *Front. Immunol.* 9:1818. doi: 10.3389/fimmu.2018.01818

Necroptosis is a pro-inflammatory cell death, which happens in the context of caspase-8 inhibition, allowing activation of the receptor interacting protein kinase 1–receptor interacting protein kinase 3–mixed lineage kinase domain-like (RIPK1–RIPK3–MLKL) axis. Recently, necroptosis has emerged as a key component of resistance against pathogens including infected macrophage by *Leishmania infantum*, the etiologic agent of Visceral leishmaniasis (VL). VL is the most severe form of Leishmaniasis, characterized by systemic inflammation and neutropenia. However, the role of neutrophil cell death in VL has not been characterized. Here, we showed that VL patients exhibited increased lactate dehydrogenase levels in the serum, a hallmark of cell death and tissue damage. We investigated the effect of necroptosis in neutrophil infection *in vitro*. Human neutrophils pretreated with zVAD-fmk (pan-caspase inhibitor) and zIETD-fmk (caspase-8 inhibitor) increased reactive oxygen species (ROS) level in response to *Leishmania* infection, which is associated with necroptotic cell death. MLKL, an important effector molecule downstream of necroptosis pathway, was also required for *Leishmania* killing. Moreover, in absence of caspases-8, murine neutrophils displayed loss of membrane integrity, higher levels of ROS, and decreased *L. infantum* viability. Pharmacological inhibition of RIPK1 or RIPK3 increased parasite survival when caspase-8 was blocked. Electron microscopy assays revealed morphological features associated with necroptotic death in *L. infantum* infected-neutrophils pretreated with caspase inhibitor, whereas infected cells pretreated with RIPK1 and RIPK3 inhibitors did not show ultra-structural alterations in membrane integrity and presented viable *Leishmania* within parasitophorous vacuoles. Taken together, these findings suggest that inhibition of caspase-8 contributes to elimination of *L. infantum* in neutrophils by triggering necroptosis. Thus, targeting necroptosis may represent a new strategy to control *Leishmania* replication.

**Keywords:** *Leishmania infantum*, neutrophils, necroptosis, cell death, RIPK3, mixed lineage kinase domain-like, caspase-8

## INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected tropical disease, caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* and is transmitted by the *phlebotomine* sandfly bite. The number of new VL cases worldwide each year is currently estimated at 300,000. *Leishmania infantum* is the etiological agent of VL in Brazil. VL is the most severe form of Leishmaniasis, which causes high morbidity and mortality in affected communities if left untreated (1, 2). Clinically, VL is a chronic infectious disease characterized by fever, weight loss, splenomegaly, hepatomegaly, anemia, cachexia, hematological alterations, and spontaneous bleeding (3, 4). Notably, neutropenia is one of the main laboratorial characteristics of patients with VL (5).

Neutrophils are the first cells recruited to the *Leishmania* infection site and can efficiently phagocytose parasites during the first hours of infection (6). Even though macrophages are the preferential host cell for *Leishmania* parasites in the chronic phase of the disease, neutrophils can also exert varied functions in the context of leishmaniasis. The role of neutrophils in leishmaniasis is controversial, as they can be protective or deleterious depending on the parasite species and the host (7–11). Concerning human VL, the role of neutrophil is also poorly characterized. It was proposed that dysfunctional neutrophils contribute to disease severity and systemic inflammatory response characteristic of VL (12). Recent studies show that neutrophils may contribute to immunosuppression in subjects with active VL (13). HLA-DR<sup>+</sup> neutrophils from VL patients do not stimulate T-cell proliferation, but they do express higher programmed cell death ligand-1 (13). Moreover, the neutrophil effects on *Leishmania* survival have also been associated with the development of an immune response after the initial stages of infection where cell death pathways can account for a pro- or anti-inflammatory microenvironment in the host (6, 8).

Necroptosis is a regulated form of cell death morphologically characterized by cell and organelle swelling, which ultimately culminates in loss of plasma membrane integrity (14, 15). Molecularly, receptor interacting protein kinases 1 and 3 (RIPK1 and RIPK3, respectively) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) are essential regulators of necroptosis that can be triggered by distinct signals including those involved in apoptosis (16–19). In contrast to necroptosis, apoptosis is an immunologically silent cell death characterized by maintenance of cell integrity that occurs in the presence of caspases. Caspase-8 mediates apoptotic cell death by cleaving and activating downstream caspases, such as caspase-3 and -7. The activation of RIPK1 is an upstream event of necroptosis. When caspase-8 is inhibited, RIPK1 promotes necroptosis by interacting with RIPK3, which mediates the phosphorylation of MLKL, which forms pore in the plasma membrane, promoting cell lysis (20–22). Moreover, necroptosis is an inflammatory cell death that contributes to innate immunity in both humans and mice by killing cells infected by pathogens (23–27). Viral, bacterial, and parasitic infections provoke release of danger signals and, consequently contribute to alert the immune system (18, 20, 21, 28). TNF-induced necroptosis requires RIP kinase activation and caspase-8 inhibition, which controls viral replication (20). More recently,

our group showed the role of necroptosis in *Leishmania* infection (28). Using human and mouse macrophages, we identified that RIPK1 and mitochondrial phosphatase phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5) are two novel host factors that control *Leishmania* replication through distinct mechanisms. PGAM5 promotes optimal IL-1 $\beta$  production, which in turn stimulates nitric oxide (NO) production, whereas RIPK1 regulates *Leishmania* replication independent of IL-1 $\beta$  (28).

In the present study, we show that inhibition of caspase-8 controls *Leishmania infantum* replication inside both, human and murine neutrophils by promoting cell membrane damage and limiting parasite replication. *Leishmania* infection in the presence of caspase-8 inhibition is marked by increased RIPK3 and MLKL expression by human neutrophils. Inhibition of MLKL reduced cell death and restored parasite replication, indicating that necroptosis is active and facilitates human neutrophil control of parasite replication. Under the same condition of caspase-8 inhibition, murine neutrophils display loss of plasma membrane integrity and formation of reactive oxygen species (ROS), suggesting a pro-inflammatory cell death profile. In addition, specific inhibition of RIPK1 or RIPK3 in murine neutrophils reversed parasite killing caused by caspase inhibition. Importantly, pretreatment of neutrophils with zVAD-fmk followed by *L. infantum* infection revealed morphological features of necroptosis in these cells by electron microscopy, whereas addition of the RIPK1 kinase inhibitor Nec-1 or the RIPK3 kinase inhibitor GSK'872 increased *L. infantum* viability in murine neutrophils. Collectively, our results point to a novel and beneficial role of neutrophils in the control of *Leishmania* replication through necroptosis induced by caspase-8 inhibition.

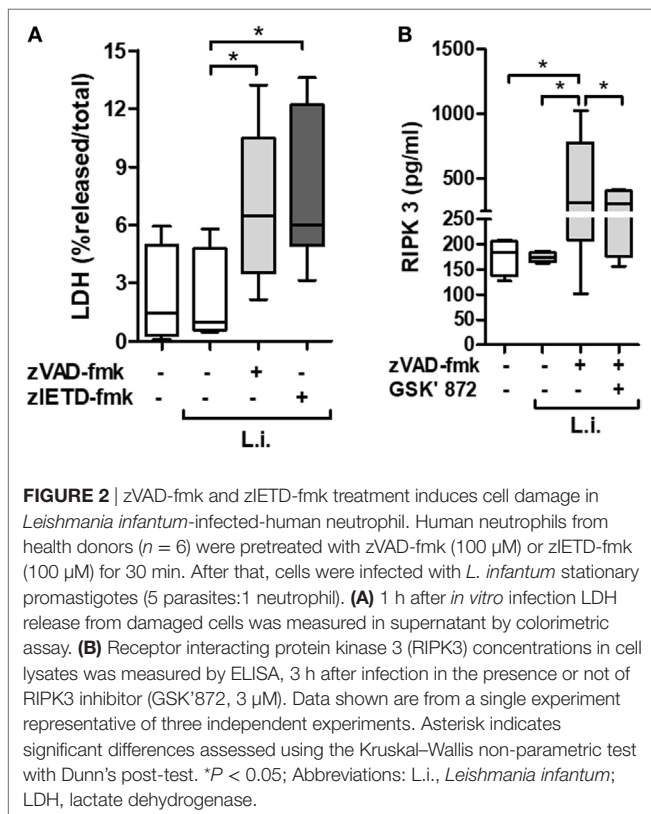
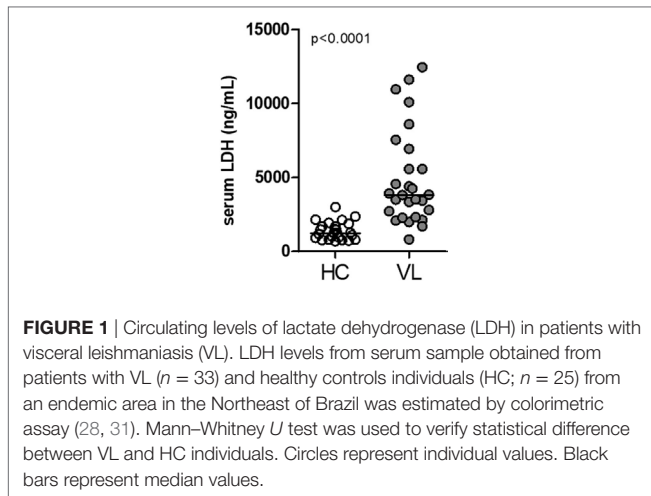
## RESULTS

### Circulating Levels of Lactate Dehydrogenase (LDH) Are Augmented in Patients With VL

Lactate dehydrogenase is a systemic biomarker of tissue/cell death damage related to necroptosis in inflammatory diseases (29, 30). Here, we evaluated the circulating levels of LDH in serum samples from patients with classical VL manifestation before anti-leishmanial therapy and non-infected subjects from the same endemic region of northeast of Brazil (endemic controls) (28, 31). These VL patients showed high plasma LDH levels compared with healthy controls (HC) ( $P < 0.0001$ ) (Figure 1).

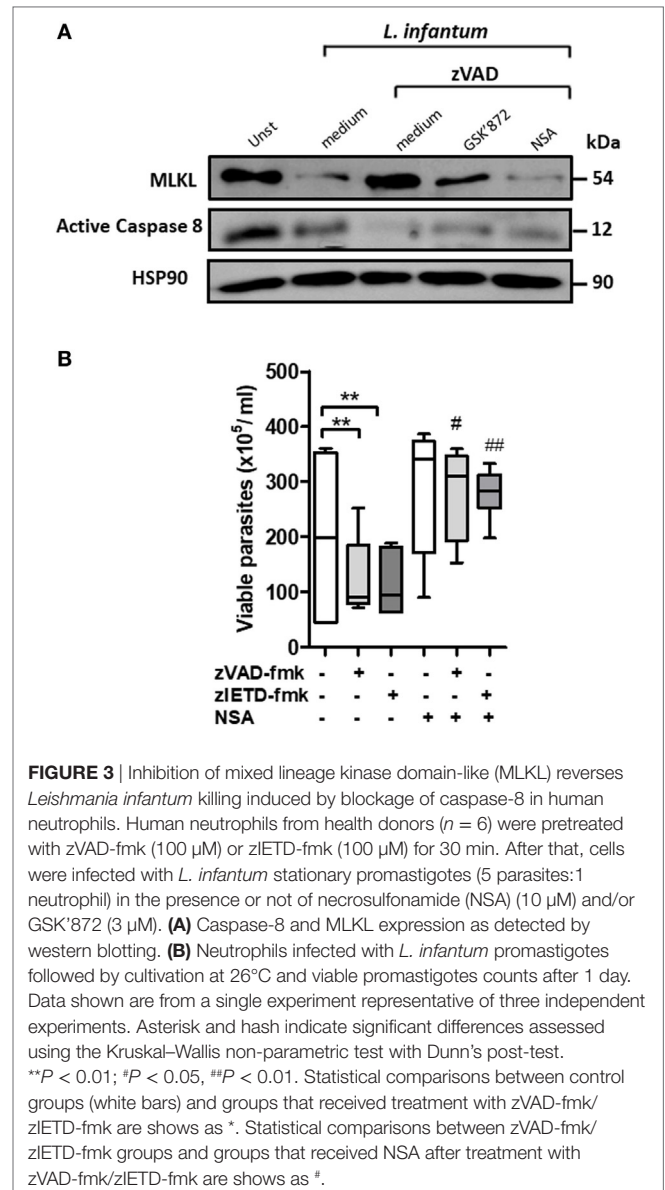
### Caspase-8 Inhibition Induces Damage in Human Neutrophils Infected by *L. infantum*

Neutropenia is one of the main clinical characteristics of patients with VL (5). To better explore the association between necroptotic cell death and neutrophil infection by *Leishmania*, we employed an *in vitro* system using primary human neutrophils previously treated with caspases inhibitors, and then infected by *L. infantum* stationary promastigotes (Figure 2). Using the pan-caspase and caspase-8-specific inhibitors, zVAD-fmk and zIETD-fmk,



respectively, we detected a significant increase in LDH levels in infected neutrophil culture supernatant, indicating cell damage by loss of plasma membrane integrity (Figure 2A).

In order to investigate the presence of specific molecules of necroptotic cell death pathway, we examined the receptor interacting protein kinase 3 (RIPK3) production by *L. infantum*-infected neutrophils in the context of caspases inhibition (Figure 2B). Cell extracts from infected neutrophils in the presence of zVAD-fmk, showed increased RIPK3 release. Interesting, a pharmacological inhibitor of RIPK3, GSK'872, was able to reduce its production (Figure 2B). In addition, we analyzed the effective inhibition of



caspase-8 in *L. infantum*-infected neutrophils pretreated with zVAD-fmk (Figure 3A). Taken together, these results suggest that *L. infantum*-infected human neutrophil undergo necroptosis when caspases, especially caspase-8, are inhibited.

### Human Neutrophils Control *L. infantum* Viability in an MLKL-Dependent Manner

Next, we investigated the role of MLKL on *Leishmania* survival inside human neutrophils. MLKL is an important downstream effector molecule in the necroptosis pathway. MLKL interacts with activated RIPK3, resulting in cell lysis, a hallmark of necroptosis (32–34). Necrosulfonamide (NSA) is an effective pharmacological inhibitor of human MLKL (33, 35). First, MLKL expression on *L. infantum*-infected neutrophil was analyzed by immunoblot (Figure 3A). Immunoblots revealed that the MLKL was increased following *L. infantum* infection when caspases



are inhibited and its reduction in the presence of RIPK3 and MLKL necroptotic inhibitors, GSK'872 and NSA, respectively (Figure 3A). Moreover, human neutrophils pretreated with the caspases inhibitors zVAD-fmk or zIETD-fmk controlled *L. infantum* replication (Figure 3B). In the presence of NSA, human neutrophils showed a significant increase in the parasite burden when compared with neutrophils pretreated only with caspase inhibitors (Figure 3B). Taken together, these results suggest that the RIPK3–MLKL-dependent necroptosis pathway is active in human neutrophils during *L. infantum* infection in the absence of caspase-8, which contributes to parasite killing.

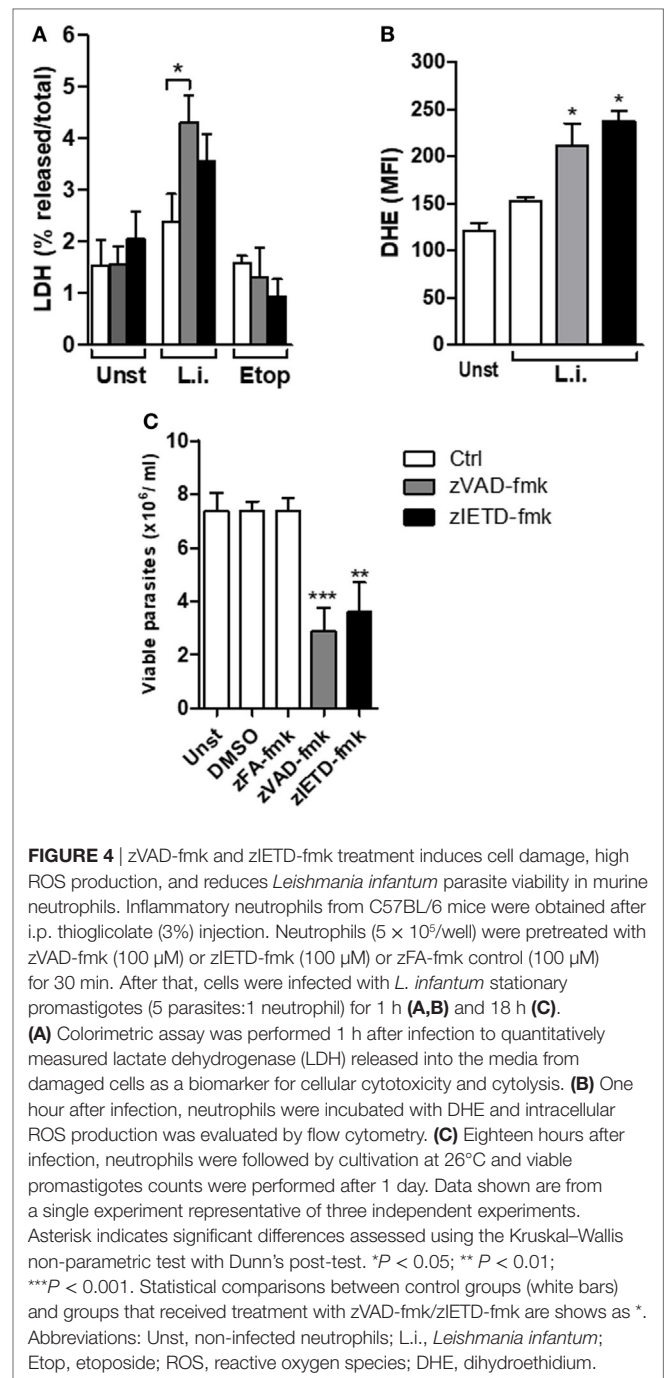
## Necroptosis Reduces *L. infantum* Viability in Murine Neutrophils

We have previously reported that murine neutrophils undergo apoptosis upon *L. infantum* infection and this effect which was enhanced by saliva of *Leishmania* vector, was correlated with increased parasite load associated with apoptosis death (36). We therefore asked whether blockage of caspases on *L. infantum*-infected neutrophils switch the immunologically silent death pathway from apoptosis to a pro-inflammatory death in these cells. First, we investigated the effect of caspase inhibition in mouse neutrophil viability using the pan-caspase and specific caspase-8 inhibitors, zVAD-fmk and zIETD-fmk, respectively (Figure 4A). In the presence of caspase inhibition, *Leishmania*-induced cell death as measured by increased LDH release was increased in infected neutrophils (Figure 4A). As control, in the presence of etoposide, an apoptosis inducer, there was no increase of LDH release in the presence of caspase inhibition (Figure 4A). In addition, we measured the generation of ROS by infected neutrophils in this system (Figure 4B). Significant increase of intracellular ROS was observed within 60 min of infection when caspases were inhibited by zVAD-fmk, and this effect was further increased with the specific caspase-8 inhibitor zIETD-fmk (Figure 4B).

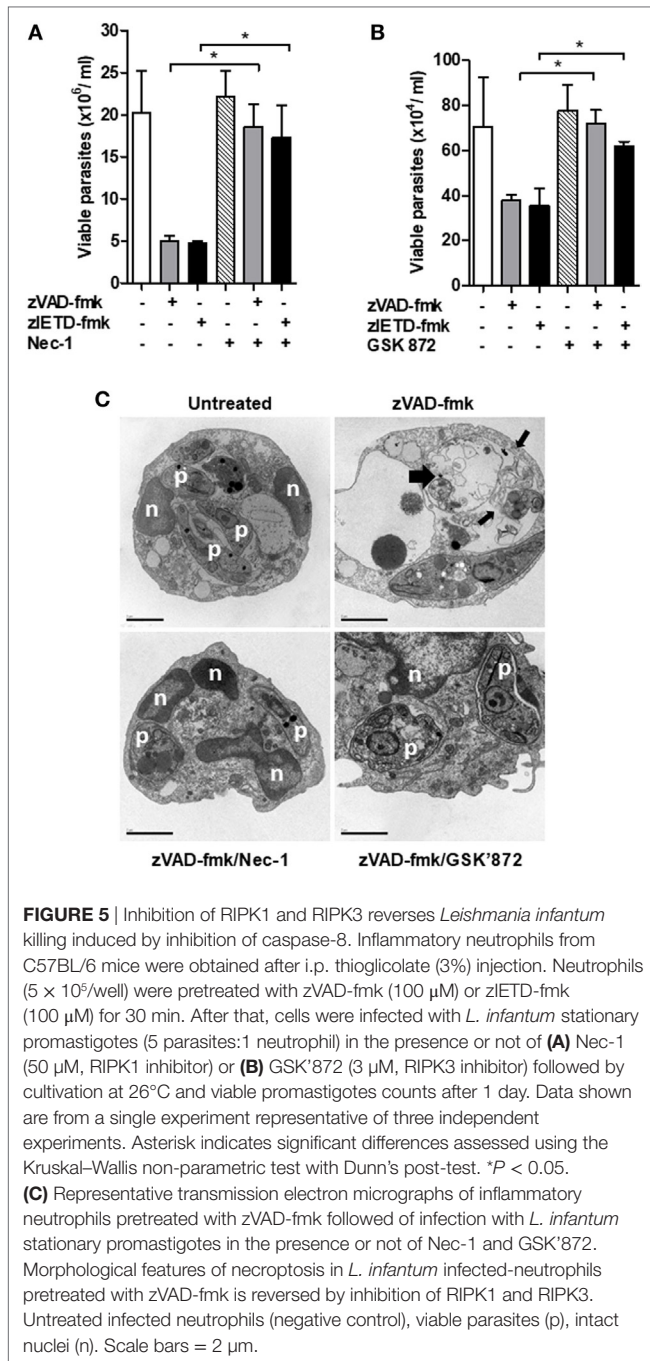
In order to investigate the impact of the switch apoptotic neutrophil death to necroptosis on *L. infantum* survival, we assessed the *in vitro* parasite viability in the cell cultures (Figure 4C). Similar to human neutrophils, we found a significant decrease in *Leishmania* viability in mouse neutrophils when caspase-8 was inhibited by pretreatment with zVAD-fmk or zIETD-fmk (Figure 4C). To rule out toxic effect of caspase inhibitors on the parasite, we tested whether treatment with zVAD-fmk or zIETD-fmk could directly affect parasite viability. We found that these inhibitors were not toxic to *Leishmania* parasites (Figure S1 in Supplementary material). These data reinforce the results obtained from human neutrophils and suggest that inhibition of caspase, specifically caspase-8, contributes to *L. infantum* killing.

## RIPK1 and RIPK3 Inhibition Abrogates *L. infantum* Killing Induced by Necroptosis

Interaction between RIPK1 and RIPK3 accounts for the formation of the ripoptosome complex, which is essential for necroptosis activation (26, 37, 38). Usually, this complex is assembled in conditions of caspase-8 inhibition (15, 26). In order to explore the involvement of the axis RIPK1–RIPK3 on *L. infantum*



replication in mice neutrophils, we performed infection assays in the presence of necrostatin-1 (Nec-1) or GSK'872, specific inhibitors of RIPK1 and RIPK3, respectively (Figure 5). C57BL/6 neutrophils pretreated with zVAD-fmk or zIETD-fmk controlled *L. infantum* replication (Figures 5A,B). Importantly, the opposite effect was observed when neutrophils were incubated with RIPK1 (Figure 5A) or RIPK3 (Figure 5B) inhibitors. Taken together, these data suggest that the RIPK1–RIPK3 complex is active during *L. infantum* infection in neutrophils when caspases are inhibited, which limited parasite replication.



After these results, we then decided to investigate whether the morphological aspects presented in *L. infantum*-infected neutrophils pretreated with the caspase inhibitor zVAD-fmk corresponds to necroptosis cell death morphology (Figure 5C). Distinct from apoptosis, necroptosis cell death is morphologically characterized by swelling of organelles and plasma membrane rupture (39–42). Transmission electronic microscopy assays revealed that zVAD-fmk pretreated *L. infantum*-infected neutrophils exhibited plasma membrane and organelle rupture (thin black arrows) and dead parasites (thick black arrows) (Figure 5C). Moreover, groups treated with inhibitors of RIPK1 (Nec-1) or RIPK3 (GSK'872)

maintained plasma membrane integrity, preserved intracellular content and interestingly, displayed viable *Leishmania* (p) within parasitophorous vacuole, in contrast with neutrophils pretreated with zVAD-fmk only. Combined, these data clearly indicate the participation of neutrophil necroptosis in *L. infantum* killing.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

This study was performed with both, human and animal neutrophils. For human, it was carried out in accordance with the recommendations of Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe, Brazil with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe, Brazil (license number: 04587312.2.0000.0058). *In vitro* experiments were performed using buffy coats from healthy blood donors at the state blood bank, Salvador, Brazil. For animals, inbred male C57BL/6 mice, aged 6–8 weeks, were obtained from the animal facility of CPqGM-FIOCRUZ (Bahia, Brazil). All experimental procedures were approved and conducted according to the Brazilian Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz—Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-FIOCRUZ, license number: 004/2014).

### Parasites Culture

*Leishmania infantum* (MCAN/BR/89/BA262) parasites were grown at 23°C in hemoflagellate-modified minimal essential medium (HOMEM medium) containing 10% (v/v) HI-FCS and 24.5 mM hemin (BOD incubator). In all experiments, the cultures were used at stationary phase.

### Mouse and Human Neutrophil Cultures

Mouse neutrophils were obtained as described previously (36, 43). Briefly, C57BL/6 mice were intra peritoneally injected with aged 3% thioglycolate (Difco, Detroit, MI, USA) solution. Seven hours after injection, peritoneal lavage was performed using 10 ml RPMI-1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 1% Nutridoma-SP (Roche, Indianapolis, IN, USA), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Exudate cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 1 h in 250 ml flasks (Costar, Cambridge, MA, USA) to remove adherent cells. Cells on supernatants were then recovered and cell viability was determined by trypan blue exclusion (>95%; data not shown). Nonadherent cells were stained with anti-Gr-1 and Ly-6G to assess neutrophil purity and were subsequently analyzed by flow cytometry using CellQuest software (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Gr-1<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup> cells were routinely >95% pure.

Human neutrophils were obtained from blood of healthy donors from Hemocentro do Estado da Bahia (Salvador, Brazil) after donors had given written, informed consent. This approach was approved by the Research Ethics Committee of FIOCRUZ-Bahia. Human neutrophils were isolated by gradient separation with polymorphonuclear medium (PMN) according to the

manufacturer's instructions (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA). Briefly, blood collected was added to vials contained PMN medium and then centrifuged for 30 min at 300 g at room temperature. Neutrophils were collected and washed three times with saline by centrifugation for 10 min at 200 g.

For *in vitro* assays, mice or human neutrophils ( $5 \times 10^5$ /well) were cultured in 200  $\mu$ l RPMI-1640 medium, supplemented with 1% Nutridoma-SP, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin in 96-well plates (Nunc, Denmark).

## Necroptosis and *Leishmania* Infection Assays

Neutrophils were infected *in vitro* with *L. infantum* promastigotes stationary-phase at a ratio of 1:2 (neutrophil:parasites). For assays of cell death, mouse and human neutrophils were pretreated for 30 min with zVAD-fmk (100  $\mu$ M) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or zIETD-fmk (100  $\mu$ M) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) to block caspase activation before infection. In some experiments, Nec-1 (50  $\mu$ M), GSK'872 (3  $\mu$ M), or NSA (10  $\mu$ M), necroptosis inhibitors (all from Merck Millipore's Calbiochem®, Darmstadt, Germany) were used. DMSO (vehicle) 0.4% (Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, USA) was used as control. After 18 h, mouse infected neutrophils, or after 3 h, human infected neutrophils, were centrifuged, supernatants containing noninternalized promastigotes were collected, and medium was replaced by 250  $\mu$ l Schneider insect medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), supplemented with 20% inactive FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin. After that, infected neutrophils were cultured at 25°C for an additional 3 days and intracellular load of *L. infantum* was estimated by production of proliferating extracellular motile promastigotes in Schneider medium (43).

## LDH Quantification

Lactate dehydrogenase activity on supernatants from *L. infantum*-cultured neutrophils was measured spectrophotometrically using a commercial LDH Cytotoxicity Detection Kit (Boehringer Mannheim) to access plasma membrane integrity. According to the manufacturer's instructions, the absorbance was recorded at 490 nm using a microELISA plate reader (490 nm). Blank LDH levels were subtracted from experimental LDH values and total LDH activity was determined by lysing the cells with 1% Triton X. The percentage of LDH release was calculated by [(LDH) sample  $\times$  100]/total (LDH).

Serum LDH was measured using an ELISA kit from Wuxi Douglin Sci. (Wuxi, China). Serum of patients with classical VL before leishmaniasis chemotherapy ( $n = 33$ ) and HC ( $n = 25$ ) was obtained from an endemic area in northeastern Brazil. The clinical and epidemiological characteristics of the study population have been previously described in detail (31, 44).

## RIPK3 ELISA Assay

For the quantitative determination of human receptor interacting protein kinase 3 (RIPK3) concentrations in cell lysates we used a Human Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 3 (RIPK3) ELISA Kit (CUSABIO). Human neutrophils

( $10^6$ /well) pretreated with for 30 min with zVAD-fmk (100  $\mu$ M) were infected with *L. infantum* in the presence of GSK'872 (3  $\mu$ M) as described above. After 3 h, human infected neutrophils were collected, diluted with 1 $\times$  PBS (pH 7.2–7.4), until cell concentration reached 100 million/ml, and stored overnight at  $-20^\circ\text{C}$ . After two freeze-thaw cycles to break up the cell membranes, lysates were centrifuged for 5 min at  $5,000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  and used to RIPK3 ELISA assay according to the manufacturer's instructions.

## Western Blot

Total cell protein was isolated from pelleted neutrophils using cell lysis buffer. Absolute protein content of lysates was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Samples were boiled at  $95^\circ\text{C}$  for 5 min and then were run on 12% SDS-PAGE gels. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, blocked with 5% fat-free milk in TBST for 1 h, and detected using rabbit anti-MLKL antibody-N-terminal (Abcam), mouse anti-caspase-8 (Enzo Life Sciences), and mouse anti-Hsp90 (BD Biosciences) monoclonal primary antibodies. Anti-rabbit MLKL, anti-mouse caspase-8, and anti-mouse-Hsp90 secondary antibodies (all from Abcam) were then applied to membrane, which were subsequently incubated with Western Blotting Detection Reagent (Thermo Scientific) and imaged using ImageQuant LAS 4000 System (GE Healthcare).

## Measurement of Intracellular ROS Production

Intracellular ROS detection in *L. infantum*-infected neutrophils cultured was performed using dihydroethidium (DHE) fluorescent probe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following analyses by FACS, according to the manufacturer's instructions. For investigation of ROS production, the purified neutrophil population was analyzed by forward- and side-scatter parameters following application of the DHE probe.

## Transmission Electron Microscopy

Neutrophils were fixed at room temperature for 2 h in 2.5% glutaraldehyde and paraformaldehyde 2% in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4. Postfixed with 1% OsO<sub>4</sub>, 0.8% potassium ferricyanide, 5 mM CaCl<sub>2</sub> in 0.1 M cacodylate buffer. Samples were washed, dehydrated in acetone, and then embedded in PolyBed 812 (Polysciences, Inc.) resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined on a Zeiss109 transmission electron microscope operating at 80 kV.

## Statistical Analyses

Each experiment was performed using at least five mice/group and it was repeated at least three times. *In vitro* assays using human neutrophils were performed with  $n = 6$ . All results are reported as mean  $\pm$  SE of representative experiments and were analyzed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data distribution from different groups was compared using the Kruskal–Wallis test with Dunn's multiple comparisons, and comparisons between two groups were explored using the Mann–Whitney test.



## DISCUSSION

The physiological role of neutrophils is directed toward the eradication of invading pathogens (45). In leishmanial infections, the role of neutrophils is controversial. Neutrophil can play a positive (46) or negative role (47) in the outcome of the infection. We previously demonstrated the sophisticated interplay between innate immune response and different cell death pathways in *Leishmania* infection (28, 36, 48, 49). Moreover, neutrophils can undergo necroptosis followed by the ligation of adhesion receptors under inflammatory conditions (50, 51).

Most studies have focused on the role of necroptosis in viral and bacterial infections (52) [reviewed in Ref. (53, 54)]. There are very few studies focusing on infectious diseases caused by protozoan parasites. Our group carried out a study investigating the involvement of necroptosis in the control of different *Leishmania* species (28). RIPK1 and PGAM5 are involved in the control of *Leishmania* replication in macrophages. Interestingly, in that study, the control of parasite replication was dependent on RIPK1 kinase activity. Collectively, these data suggest a potential role for necroptosis in the control of *Leishmania* viability by different cell types. Nevertheless, histology sections of wild type, Ripk1<sup>kd/kd</sup>, and Pgam5<sup>-/-</sup> mice infected with *Leishmania amazonensis* revealed tissue inflammation marked by neutrophil infiltration (28), indicating the importance of these cells in the context of *Leishmania* infection. However, the precise mechanisms or molecules involved in this cell death pathway could be distinct in different cells.

Despite the importance of neutrophils in human VL, the role of neutrophil necroptosis upon *Leishmania* infection had not been investigated. Assessment of a biomarker of cell/tissue damage related to inflammatory cell death, revealed high circulating levels of LDH in VL patients. LDH is a systemic biomarker of cell damage that could be related to necroptosis (29, 30). Because inflammatory imbalance and neutropenia are hallmarks of human VL, we investigated the mechanisms involved in neutrophil cell death when caspases are pharmacologically inhibited before infection with *Leishmania infantum*. We found that specific caspase-8 inhibition contributes to *L. infantum* killing by RIPK1–RIPK3–MLKL-dependent necroptosis, in both human and mouse neutrophils.

In the presence of the pan-caspase inhibitor zVAD-fmk, we noticed human and mouse neutrophil cell death with an early release of LDH. We have previously demonstrated that *L. chagasi* (syn. *infantum*) induces mouse neutrophil apoptosis (36), a non-inflammatory programmed form of cell death involving caspases. In the context of caspase inhibition, these serine proteases could switch apoptosis to necroptosis, a pro-inflammatory and regulated form of cell death, characterized by loss of plasma membrane permeability and release of intracellular contents, as LDH. In this regard, our data obtained with mouse neutrophils combined with our previous data (36) reinforce the possibility of the use of specific pharmacological inhibitors of caspases such as zVAD-fmk to promotes a switch from apoptosis to others types of regulated cell death on mammalian system (55, 56).

Herein, inhibition of human and mouse neutrophil apoptosis by zVAD-fmk or zIETD-fmk reduced the number of viable

parasite within those cells. zVAD-fmk is the most commonly used pan-caspase inhibitor and it has been demonstrated to have low cytotoxicity *in vitro* and *in vivo* (57–60). However, zVAD-fmk can induce necrotic cell death in certain cell lines (61, 62). We rule out the possibility of zVAD-fmk being involved in neutrophil necrotic death by performing cytotoxicity assays (data not shown). Moreover, we also analyzed whether there is any cytotoxic effect of zVAD-fmk on *L. infantum* promastigotes. Indeed, we did not observe alteration on *Leishmania* parasites grow curve. Using a specific caspase-8 inhibitor zIETD-fmk, we reinforce the idea that in the absence of caspase-8, *L. infantum*-infected neutrophils cell death switches from apoptosis to necroptosis with a pro-inflammatory profile, represented by increased ROS production. ROS contribute to the execution of necroptosis (41). It has been observed that ROS triggers necroptosis by promoting peroxylation of lipids, proteins, and DNA, or as second messengers in the signaling pathways of death receptors (41, 63).

It is known that superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and NO are two important molecules critical in controlling *Leishmania* infection (64, 65). *L. infantum* replication in macrophages was controlled through distinct mechanisms involving NO and IL-1β (28). Here, we did not find detectable IL-1β in our assays in neutrophils, discarding the possibility of canonical pyroptosis. Neutrophils, monocytes, and macrophages can control parasites by ROS that are produced by the respiratory burst after phagocytosis (66, 67). Moreover, recently our group shows that heme drives oxidative stress-associated cell death in human neutrophils infected by *L. infantum* (49). Also, in hemorrhagic shock models, it was demonstrated that exosomes released from macrophages promote neutrophil necroptosis mainly by NADPH oxidase-derived ROS production within neutrophils (68). Whether ROS are involved in *L. infantum* viability control during neutrophil necroptosis remains to be investigated.

Here, RIPK3 was released extracellularly after treatment with zVAD-fmk. Although RIPK3 is an intracellular protein which acts in programmed cell death pathways, extracellular release of RIPK3 following necroptosis was previously related on plasma and/or culture supernatants (69). Nevertheless, recently it was described that RIPK1 and RIPK3 could be involved in inflammatory process independently of necroptosis induction (70). RIPK1 and RIPK3 pharmacological inhibition was found to restore *L. infantum* growth in murine neutrophils pretreated with zVAD-fmk or zIETD-fmk. We performed *in vitro* assays using pharmacological inhibitors: Nec-1 (RIPK1 inhibitor) or GSK'872 (RIPK3 inhibitor). We came to the conclusion that reduced parasite grown inside neutrophil, in the context of caspase inhibition was due to induction of necroptosis.

Electron microscopy (EM) remains an important qualitative method to detect cell death morphological features. On EM images, necrotic/necroptotic cells display loss of membrane integrity, low cytoplasm density, disintegrated cell membrane, loss of chromatin, increase in cell volume, swelling of organelles, and cellular collapse (53, 71). Herein, EM images revealed morphological features of necroptosis in *L. infantum*-infected neutrophils subsequent to zVAD-fmk treatment. Interestingly, these morphological aspects of necroptosis were prevented by using Nec-1 and GSK'872. Nec-1 is an allosteric RIPK1 kinase inhibitor

able to prevent the formation and activation of RIPK1–RIPK3 complexes (17), whereas GSK'872 inhibits specifically RIPK3 phosphorylation (72). Here, we provide evidence that RIPK1 and RIPK3 are activated in *L. infantum*-infected neutrophils in the absence of caspase-8, thereby promoting neutrophil necroptotic death and killing of *L. infantum* parasites.

Recent evidence described that necroptotic cell death occurs upon the assembly of a large, signal-induced multiprotein complex containing RIPK1, RIPK3, and MLKL, namely necrosome (73). Active MLKL either directly or indirectly destabilizes plasma membrane integrity leading to cell swelling, membrane rupture, and DAMPs release (33, 74, 75). Since MLKL inhibitors specific for mouse cells are not available, we tested here the participation of MLKL using human neutrophils treated with the NSA, a human MLKL inhibitor. Indeed, we found that caspase inhibition contributes to the control of parasite viability in neutrophils *via* MLKL. Moreover, as in the process of necroptosis, MLKL functions as a substrate to RIPK3, it seems that RIPK3 inhibition reduced the expression of MLKL and, consequently the necroptotic *L. infantum*-infected neutrophils.

In summary, our data suggest that interference of neutrophil apoptosis by inhibition of caspases contributes to elimination of *L. infantum* parasites, probably by stimulating an inflammatory response associated with RIPK1–RIPK3–MLKL-dependent necroptosis. In this context, targeting neutrophil cell death pathways by necroptosis may be new strategies to treat human VL.

## ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe, Brazil with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe, Brazil (license number: 04587312.2.0000.0058). All experimental procedures using animals were approved and conducted according to the Brazilian Committee on the Ethics

## REFERENCES

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* (2012) 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- WHO. WHO: Weekly epidemiological record: global leishmaniasis update, 2006–2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. *World Health Organization* (2017) 92(38):557–72. doi:10.1186/1750-9378-2-15
- Costa PL, Dantas-Torres F, da Silva FJ, Guimarães VCFV, Gaudêncio K, Brandão-Filho SP. Ecology of *Lutzomyia longipalpis* in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. *Acta Trop* (2013) 126(2):99–102. doi:10.1016/j.actatropica.2013.01.011
- Belić A, Pejin D, Stefanović N, Spasojević J, Đurković D. Hematologic characteristics of leishmaniasis. *Med Pregl* (2000) 53(1-2):89–91.
- De Queiroz A, Cavalcanti NV. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* (2010) 4(11):e877. doi:10.1371/journal.pntd.0000877
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kamhawi S, Lawyer PG, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* (2009) 321(5891):970–4. doi:10.1126/science.1159194

of Animal Experiments of the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz—Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-FIOCRUZ, license number: 004/2014).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

LAB, PF, MA, NL, MB, VB, and DP conceived and designed the study. LAB, PF, LJB, FR, MA, NL, GQ-C, JL, and DP performed the experiments. LAB, PF, LJB, FR, MA, NL, MB, FC, VB, and DP contributed with data analysis. MB, RA, VB, and DP provided materials and infrastructural support. LAB, NL, MB, FC, VB and DP wrote and revised the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs. Elze Leite and Mrs. Andrezza Souza (FIOCRUZ, Bahia) for technical and logistic support.

## FUNDING

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia-FAPESB (JCB0047/2013 to DP, 5760/2015 to VB) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (482722/2013-4 to DP, 552721/2011-5 and 019.203.02712/2009-8 FAPITEC/CNPq to RA). RA also received a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES: 23038.005304/2011-01). NFL received funding from CAPES (grants 88887.142000/2017-00 and 88887.137958/2017-00). FC is supported by NIH grant AI119030. LAB and LJB received a fellowship from CNPq. VB, MB, and RA are senior investigators from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01818/full#supplementary-material>.

- Gueirard P, Laplante A, Rondeau C, Milon G, Desjardins M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol* (2008) 10(1):100–11. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01018.x
- Guimara AB. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106(16): 6748–53. doi:10.1073/pnas.0900226106
- Mcfarlane E, Perez C, Allenbach C, Carter KC, Alexander J, Tacchini-cottier F. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* (2008) 76(2):532–41. doi:10.1128/IAI.01388-07
- Rousseau D, Demartino S, Ferrua B, Michiels JF, Anjuère F, Fragaki K, et al. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol* (2001) 1(1):17. doi:10.1186/1471-2180-1-17
- van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* (2004) 173(11):6521–5. doi:10.4049/jimmunol.173.11.6521
- Yizengaw E, Getahun M, Tajebe F, Cervera EC, Adem E, Mesfin G, et al. Visceral leishmaniasis patients display altered composition and maturity of neutrophils

- as well as impaired neutrophil effector functions. *Front Immunol* (2016) 7:517. doi:10.3389/fimmu.2016.00517
13. Sharma S, Davis RE, Srivastva S, Nylén S, Sundar S, Wilson ME. A subset of neutrophils expressing markers of antigen-presenting cells in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* (2016) 214(10):1531–8. doi:10.1093/infdis/jiw394
  14. Kearney CJ, Martin SJ. Perspective an inflammatory perspective on necroptosis. *Mol Cell* (2017) 65(6):965–73. doi:10.1016/j.molcel.2017.02.024
  15. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* (2015) 517(7534):311–20. doi:10.1038/nature14191
  16. Chan FKM, Baehrecke EH. RIP3 finds partners in crime. *Cell* (2012) 148(1–2):17–8. doi:10.1016/j.cell.2011.12.020
  17. Degterev A, Hitomi J, Gernscheid M, Chén IL, Korkina O, Teng X, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* (2008) 4(5):313–21. doi:10.1038/nchembio.83
  18. Dondelinger Y, Darding M, Bertrand MJM, Walczak H. Poly-ubiquitination in TNFR1-mediated necroptosis. *Cell Mol Life Sci* (2016) 73(11–12):2165–76. doi:10.1007/s00018-016-2191-4
  19. Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ . *Cell* (2009) 137(6):1100–11. doi:10.1016/j.cell.2009.05.021
  20. Chan FKM, Shisler J, Bixby JG, Felices M, Zheng L, Appel M, et al. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem* (2003) 278(51):51613–21. doi:10.1074/jbc.M305633200
  21. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* (2009) 137(6):1112–23. doi:10.1016/j.cell.2009.05.037
  22. Lyon CB, Umr C, Lyon D. Review roles of caspases in necrotic cell death. *Cell* (2016) 167(7):1693–704. doi:10.1016/j.cell.2016.11.047
  23. Chan FKM, Luz NF, Moriwaki K. Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Ann Rev Immunol* (2014) 33:79–106. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112248
  24. Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Publ Group* (2017) 17(3):151–64. doi:10.1038/nri.2016.147
  25. Mocarski ES, Guo H, Kaiser WJ. Necroptosis: the Trojan horse in cell autonomous antiviral host defense. *Virology* (2015) 47(9–480):160–6. doi:10.1016/j.virol.2015.03.016
  26. Moriwaki K, Chan FKM. RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation. *Gen Dev* (2013) 27(15):1640–9. doi:10.1101/gad.223321.113
  27. Pfeiffer T, Morley A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front Mol Biosci* (2014) 1:17. doi:10.3389/fmolb.2014.00017
  28. Farias Luz N, Balaji S, Okuda K, Barreto AS, Bertin J, Gough PJ, et al. RIPK1 and PGAM5 control *Leishmania* replication through distinct mechanisms. *J Immunol* (2016) 196(12):5056–63. doi:10.4049/jimmunol.1502492
  29. Chtourou Y, Slima AB, Makni M, Gdoura R. Naringenin protects cardiac hypercholesterolemia-induced oxidative stress and subsequent necroptosis in rats. *Pharmacol Rep* (2015) 67(6):1090–7. doi:10.1016/j.pharep.2015.04.002
  30. Takemoto K, Hatano E, Iwasako K, Takeiri M, Noma N, Ohmae S, et al. Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure. *FEBS Open Bio* (2014) 4:777–87. doi:10.1016/j.fob.2014.08.007
  31. Luz NF, Andrade BB, Feijo DF, Araujo-Santos T, Carvalho GQ, Andrade D, et al. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. *J Immunol* (2012) 188(9):4460–7. doi:10.4049/jimmunol.1103072
  32. Orzalli MH, Kagan JC. Apoptosis and necroptosis as host defense strategies to prevent viral infection. *Trends Cell Biol* (2017) 27(11):800–9. doi:10.1016/j.tcb.2017.05.007
  33. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* (2012) 148(1–2):213–27. doi:10.1016/j.cell.2011.11.031
  34. Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, Choksi S, Li Q, Luo J, et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109(14):1–6. doi:10.1073/pnas.1200012109
  35. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* (2005) 1(2):112–9. doi:10.1038/nchembio711
  36. Prates DB, Araujo-Santos T, Luz NF, Andrade BB, Franca-Costa J, Afonso L, et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *J Leukoc Biol* (2011) 90(3):575–82. doi:10.1189/jlb.0211105
  37. Silke J, Rickard JA, Gerlic M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nat Immunol* (2015) 16(7):689–97. doi:10.1038/ni.3206
  38. Thapa RJ, Nogusa S, Chen P, Maki JL, Lerro A, Andrade M, et al. Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110(33):E3109–18. doi:10.1073/pnas.1301218110
  39. Karch J, Kanisicak O, Brody MJ, Sargent MA, Michael DM, Molkenin JD. Necroptosis interfaces with MOMP and the MPTP in mediating cell death. *PLoS One* (2015) 10(6):e0130520. doi:10.1371/journal.pone.0130520
  40. Sangiuliano B, Pérez NM, Moreira DF, Belizário JE. Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and control. *Mediators Inflamm* (2014) 2014:821043. doi:10.1155/2014/821043
  41. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Publ Group* (2010) 11(10):700–15. doi:10.1038/nrm2970
  42. Zhang Y, Han J. Electrophysiologist shows a cation channel function of. *Nat Publ Group* (2016) 26(6):643–4. doi:10.1038/cr.2016.64
  43. Ribeiro-gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-de-souza MCA, Cysne-finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* (2017) 172(7):4454–62. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4454
  44. Araújo-Santos T, Andrade BB, Gil-Santana L, Luz NF, dos Santos PL, de Oliveira FA, et al. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. *Sci Rep* (2017) 7(1):4334. doi:10.1038/s41598-017-04595-8
  45. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* (2010) 2(3):216–27. doi:10.1159/000284367
  46. Guimarães-Costa AB, DeSouza-Vieira TS, Paletta-Silva R, Freitas-Mesquita AL, Meyer-Fernandes JR, Saraiva EM. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. *Infect Immun* (2014) 82(4):1732–40. doi:10.1128/IAI.01232-13
  47. Hurrell BP, Schuster S, Grün E, Coutaz M, Williams RA, Held W, et al. Rapid sequestration of *Leishmania mexicana* by neutrophils contributes to the development of chronic lesion. *PLoS Pathog* (2015) 11(5):e1004929. doi:10.1371/journal.ppat.1004929
  48. Falcão SAC, Weinkopf T, Hurrell BP, Celes FS, Curvelo RP, Prates DB, et al. Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. *PLoS Negl Trop Dis* (2015) 9(3):e0003601. doi:10.1371/journal.pntd.0003601
  49. Quintela-Carvalho G, Farias Luz N, Celes F, Zanetta D, Andrade D, Menezes D, et al. Heme drives oxidative stress-associated cell death in human neutrophils infected with *Leishmania infantum*. *Front Immunol* (2017) 8:1620. doi:10.3389/fimmu.2017.01620
  50. Mihalache CC, Yousefi S, Conus S, Villiger PM, Schneider EM. Inflammation-associated autophagy-related programmed necrotic death of human neutrophils characterized by organelle fusion events. *J Immunol* (2011) 186(11):6532–42. doi:10.4049/jimmunol.1004055
  51. Wang X, He Z, Liu H, Yousefi S, Simon H. Neutrophil necroptosis is triggered by ligation of adhesion molecules following GM-CSF priming. *J Immunol* (2016) 197(10):4090–100. doi:10.4049/jimmunol.1600051
  52. Weng D, Marty-Roix R, Ganesan S, Proulx MK, Vladimer GI, Kaiser WJ, et al. Caspase-8 and RIP kinases regulate bacteria-induced innate immune responses and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111(20):7391–6. doi:10.1073/pnas.1403477111
  53. Belizário J, Vieira-Cordeiro L, Enns S. Necroptotic cell death signaling and execution pathway: lessons from knockout mice. *Mediators Inflamm* (2015) 2015:128076. doi:10.1155/2015/128076
  54. Moreno-Gonzalez G, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: a novel cell death modality and its potential relevance for critical care medicine. *Am*



- J Respir Crit Care Med* (2016) 194(4):415–28. doi:10.1164/rccm.201510-2106CI
55. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* (2015) 22(1):58–73. doi:10.1038/cdd.2014.137
  56. Marsden VS, Connor LO, Reilly LAO, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, et al. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome *c*/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* (2002) 419:6–9. doi:10.1038/nature01101
  57. McComb S, Shutinoski B, Thurston S, Cessford E, Kumar K, Sad S. Cathepsins limit macrophage necroptosis through cleavage of rip1 kinase. *J Immunol* (2014) 192(12):5671–8. doi:10.4049/jimmunol.1303380
  58. Ni HM, McGill MR, Chao X, Woolbright BL, Jaeschke H, Ding WX. Caspase inhibition prevents tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and promotes necrotic cell death in mouse hepatocytes in vivo and in vitro. *Am J Pathol* (2016) 186(10):2623–36. doi:10.1016/j.ajpath.2016.06.009
  59. Silva EM, Guillermo LVC, Ribeiro-Gomes FL, De Meis J, Nunes MP, Senra JFV, et al. Caspase inhibition reduces lymphocyte apoptosis and improves host immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol* (2007) 37(3):738–46. doi:10.1002/eji.200636790
  60. van den Berg E, Bal SM, Kuipers MT, Matute-Bello G, Lutter R, Bos AP, et al. The caspase inhibitor zVAD increases lung inflammation in pneumovirus infection in mice. *Physiol Rep* (2015) 3(3):1–12. doi:10.14814/phy2.12332
  61. Van Noorden CJF. Editorial the history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem* (2001) 251:241–51. doi:10.1078/0065-1281-00601
  62. Wu YT, Tan HL, Huang Q, Kim YS, Pan N, Ong WY, et al. Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death. *Autophagy* (2008) 4(4):457–66. doi:10.4161/auto.5662
  63. Challa S, Chan FKM. Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases. *Cell Mol Life Sci* (2010) 67(19):3241–53. doi:10.1007/s00018-010-0413-8
  64. Carneiro PP, Conceição J, Macedo M, Magalhães V, Carvalho EM, Bacellar O. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. *PLoS One* (2016) 11(2):e0148084. doi:10.1371/journal.pone.0148084
  65. Channon JY, Roberts MB, Blackwell JM. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology* (1984) 53(2):345–55.
  66. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, et al. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal* (2013) 19(6):595–637. doi:10.1089/ars.2012.4785
  67. Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SMB, Eliana T, et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol* (2017) 167(2):893–901. doi:10.4049/jimmunol.167.2.893
  68. Jiao Y, Li Z, Loughran PA, Fan EK, Scott MJ, Li Y, et al. Frontline science: macrophage-derived exosomes promote neutrophil necroptosis following hemorrhagic shock. *J Leukoc Biol* (2017) 103(2):175–83. doi:10.1189/jlb.3HI0517-173R
  69. Qing DY, Conegliano D, Shashaty MGS, Seo J, Reilly JP, Worthen GS, et al. Red blood cells induce necroptosis of lung endothelial cells and increase susceptibility to lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* (2014) 190(11):1243–54. doi:10.1164/rccm.201406-1095OC
  70. Najjar M, Saleh D, Zelic M, Nogusa S, Shah S, Tai A, et al. RIPK1 and RIPK3 kinases promote cell-death-independent inflammation by toll-like receptor 4. *Immunity* (2016) 45(1):46–59. doi:10.1016/j.immuni.2016.06.007
  71. Sachet M, Yu Y, Oehler R. The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis* (2017) 22(10):1189–204. doi:10.1007/s10495-017-1413-z
  72. Mandal P, Berger SB, Pillay S, Moriwaki K, Huang C, Guo H, et al. RIP3 induces apoptosis independent of pro-necrotic kinase activity. *Mol Cell* (2014) 56(4):481–95. doi:10.1016/j.molcel.2014.10.021
  73. Remijsen Q, Goossens V, Grootjans S, Haute C, Van Den Vanlangenakker N, Dondelinger Y, et al. Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis. *Cell Death Dis* (2014) 5(1):e1004–8. doi:10.1038/cddis.2013.531
  74. Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell* (2014) 54(1):133–46. doi:10.1016/j.molcel.2014.03.003
  75. Xia B, Fang S, Chen X, Hu H, Chen P, Wang H, et al. MLKL forms cation channels. *Nat Publ Group* (2016) 26(5):517–28. doi:10.1038/cr.2016.26

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that they do not have a commercial association that might pose a conflict of interest.

The handling Editor declared a shared affiliation, though no other collaboration, with one of the authors MB.

Copyright © 2018 Barbosa, Fiuza, Borges, Rolim, Andrade, Luz, Quintela-Carvalho, Lima, Almeida, Chan, Bozza, Borges and Prates. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 5. DISCUSSÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma das manifestações clínicas mais graves da Leishmaniose, apresentando-se como uma doença de perfil inflamatório. Neutrófilos, como primeira linha de defesa contra infecções, têm sido descritos com diferentes atuações na infecção por *Leishmania spp.* Na LV, a neutropenia representa uma das características clínicas de gravidade da doença. Recentemente, nosso grupo demonstrou morte celular associada ao estresse oxidativo em neutrófilos infectados por *Leishmania infantum* (QUINTELA-CARVALHO *et al.*, 2017). No presente estudo, observamos altos índices de LDH em pacientes com LV. Encontramos também altos níveis de LDH liberados por neutrófilos humanos e murinos infectados com *L. infantum in vitro*, após tratamento com inibidores de caspases. Além disso, foi observado um aumento da expressão de RIPK3 e de MLKL (moléculas essenciais da necroptose) em neutrófilos humanos, nesse sistema. Associado a estes eventos, a carga parasitária nesses neutrófilos reduziu sob inibição de caspases e esse efeito foi revertido com inibidores farmacológicos específicos da via de morte por necroptose.

Nossos dados obtidos a partir do soro de pacientes com LV evidenciaram altos níveis séricos da enzima LDH em comparação com indivíduos saudáveis residentes na mesma área endêmica para LV. Além disso, os neutrófilos humanos e murinos infectados *in vitro* com *L. infantum* também apresentaram altos níveis de LDH, quando comparados com controles não infectados. A lactato desidrogenase (LDH) pode ser usada como um marcador sistêmico de dano celular/tecidual, relacionado à necroptose em doenças inflamatórias (CHTOUROU *et al.*, 2015; TAKEMOTO *et al.*, 2014). De fato, a literatura evidencia a análise dessa molécula como um indicador de gravidade em algumas doenças pró-inflamatórias. (CHTOUROU *et al.*, 2015; TAKEMOTO *et al.*, 2014). Embora a liberação de LDH não seja um parâmetro específico de morte celular por necroptose, esses dados sugerem uma possível associação de eventos de necroptose que podem ocorrer no contexto da LV, abrindo possibilidades para investigação. Foi observado, entretanto, uma grande variação nos níveis da LDH liberados pelos pacientes de LV. Isso pode ser devido às diferentes manifestações clínicas da doença, que pode variar de assintomática a aquela com características mais inflamatórias – quadro clínico patológico clássico da doença. Essas diferenças clínicas ocorrem de acordo com a resposta imunológica do indivíduo



ou as diferentes fases da infecção, aguda ou crônica (BACELLAR e CARVALHO, 2005; GOTO e PRIANTI, 2009; NYLE, 2007).

A neutropenia foi correlacionada com altos níveis de LDH em pacientes com LV (QUINTELA-CARVALHO *et al.*, 2017). Esses achados recentes do nosso grupo sugerem um papel para os neutrófilos na patogênese da LV. Nesse trabalho, nós investigamos o papel da necroptose em neutrófilos durante a infecção por *L. infantum* na condição de inibição de caspase 8. A inibição geral de caspases, com zVAD-fmk, e específica de caspase 8, com zIETD-fmk, tem sido relatada em diferentes tipos celulares como modelo de indução de necroptose *in vitro* (WU *et al.*, 2011). Nestes, frequentemente, os gatilhos são ligantes da família de receptores de morte associados à família do TNF- $\alpha$ . Entretanto, esse fenômeno ainda não havia sido descrito em neutrófilos, sobretudo no contexto de infecção. Embora não tenhamos investigado qual/quais gatilho(s) podem está induzindo a necroptose dos neutrófilos infectados quando a caspase 8 é inibida, podemos destacar aqui, pela primeira vez, a indução dessa via de morte em neutrófilos infectados por *Leishmania infantum*. Além disso, foi possível observar o envolvimento das moléculas da via e o impacto na sobrevivência do parasita.

A ideia de que na ausência de caspase-8 a via de morte celular é direcionada para a necroptose, é reforçada, uma vez que na presença de inibidores de caspase 8 (tais como o zIETD-fmk) foi possível observar um aumento na produção de EROs, indicador de morte celular com um perfil pró-inflamatório (VANDENABEELE *et al.*, 2010). Além disso, sabe-se que a inibição farmacológica de uma via de morte, pode desviar a célula para outra via de morte com caracteres e consequências distintas (GALLUZZI, 2018). Nosso grupo demonstrou, previamente, que *L. infantum* induz a apoptose em neutrófilos murinos, com liberação de mediadores anti-inflamatórios e contribuindo para a replicação do parasita (PRATES *et al.*, 2011). Aqui, na presença do inibidor geral de caspases foi observada a liberação precoce de LDH por neutrófilos infectados por *L. infantum*. Nesta mesma estratégia experimental, observamos a liberação da enzima RIPK3 por neutrófilos infectados, permitindo-nos associar a morte dessas células com a necroptose. Apesar de RIPK3 ser uma proteína intracelular envolvida em vias de morte programada, a liberação de RIPK3 extracelular, em casos de necroptose, já foi relatada no plasma e/ou sobrenadantes de cultura em um trabalho que estudou a necroptose em células endoteliais do pulmão (QING *et al.*, 2014). Apesar de se discutir o significado funcional da RIPK3 extracelular, esta pode

ser um marcador de doenças relacionadas com necroptose (QING *et al.*, 2014). Em conjunto, esses resultados concordam com trabalhos anteriores que sugerem que na ausência de caspases, a via de morte por necroptose é ativada (FELTHAM *et al.*, 2017; MIHALY *et al.*, 2017).

Demonstramos também, pela primeira vez, que na inibição de caspases ocorreu uma redução da viabilidade parasitária da *L. infantum* na cultura de neutrófilos humanos e murinos. Essa redução pode ser associada à morte dos neutrófilos por necroptose uma vez que a inibição farmacológica das moléculas RIPK1, RIPK3 e MLKL reverteu esse efeito. As moléculas RIPK1, RIPK3 e MLKL são reconhecidamente formadoras do complexo intracelular chamado necrossoma, desencadeador de necroptose em diferentes tipos celulares (GALLUZZI *et al.*, 2015; KAISER *et al.*, 2013). Nossos dados de inibição farmacológica de RIPK1 e RIPK3 utilizando Nec-1 e GSK'872, respectivamente, evidenciam a participação dessas duas moléculas do necrossoma (RIPK1 e RIPK3) em neutrófilos murinos infectados por *L. infantum*. Em relação a inibição farmacológica de MLKL, ensaios com neutrófilos humanos mostraram a efetividade do inibidor NSA, com diferença estatisticamente significativa. Dado que se discute que a ação farmacológica da necrosulfonamida (NSA) não é efetiva em células de camundongos, esse resultado em neutrófilos humanos fortalece nossa hipótese do envolvimento da MLKL também em nosso modelo experimental. Dados do Western Blotting, reforçaram esse resultado, mostrando uma alta expressão da MLKL na ausência de caspases, quando possivelmente a necroptose está ocorrendo, corroborando para a sua importância nesse eixo de morte. Em conjunto, esses dados nos permitiram a observação tanto do papel da inibição de caspases na morte dos parasitos, quanto da associação desse evento com a necroptose, sugerindo um perfil pró-inflamatório dependente do eixo RIPK1-RIPK3-MLKL. A ativação de RIPK1 é um evento inicial da necroptose. Quando em presença de um inibidor de caspase, a RIPK1 conduz à necroptose, ao interagir com a RIPK3. E esta, quando fosforilada, ativa a MLKL, induzindo a formação de poros na membrana e lise celular (CHAN *et al.*, 2003; CHO *et al.*, 2010; LYON *et al.*, 2016).

O zVAD-fmk é amplamente utilizado para inibir apoptose e pode induzir a morte por necroptose em certas linhagens celulares (NOORDEN, 2001; WU *et al.*, 2008), mostrando ter baixa citotoxicidade *in vitro*. Deste modo, é o inibidor de caspases mais comumente utilizado. Nós confirmamos que a morte dos parasitas estava correlacionada à necroptose de neutrófilos e não ao efeito das drogas utilizadas no

sistema in vitro, sobretudo o zVAD-fmk. Esse efeito foi testado em curva de crescimento de *L. infantum* in vitro (anexo 1).

Já havia sido demonstrado que neutrófilos podem sofrer necroptose seguida da ligação de receptores de adesão em condições inflamatórias (MIHALACHE *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017). Também, em modelos de choque hemorrágico, os exossomos liberados a partir de macrófagos promovem a necroptose de neutrófilos principalmente pela produção de EROs derivada de NADPH oxidase pelos neutrófilos (JIAO *et al.*, 2017). Nesses modelos, os eventos intracelulares envolvidos também evidenciaram a ativação das moléculas RIPK1 e RIPK3.

Foi observada uma maior liberação de LDH por neutrófilos murinos infectados por *L. infantum*, quando comparada com o grupo de células expostas ao Etoposídeo, uma droga indutora de apoptose (KARPINICH *et al.*, 2002). Isso sugere que existem indutores específicos associados ao desvio da via de morte dos neutrófilos apoptóticos para uma morte pró-inflamatória quando há inibição farmacológica das caspases. Neste caso, a infecção dos neutrófilos pela *L. infantum* poderia ser um deles. Não analisamos qual o estímulo está desencadeando a necroptose nos neutrófilos infectados por *L. infantum*. É possível que a própria *L. infantum* esteja ativando receptores que resultem na necroptose, quando as caspases são inibidas. De fato, sabe-se que a necroptose pode ter diferentes fatores desencadeantes, além dos receptores da família do TNF. A ativação de Receptores de Reconhecimento de Padrões associados a patógenos (PRRs) pode ser um destes fatores. Em estudos com células do sistema nervoso e outras células de linhagem já foi evidenciado que receptores do tipo Toll (*Toll like receptors*), TLR2, TLR3 e TLR4 estão envolvidos na morte celular por necroptose (HUANG *et al.*, 2017; KAISER *et al.*, 2013; KIM e LI, 2013). Futuras investigações permitirão responder essa pergunta.

O resultado da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), uma técnica qualitativa importante para detectar as características morfológicas de morte celular, mostrou que os neutrófilos murinos pré-tratados com zVAD-fmk exibiram características morfológicas de necroptose, com perda de integridade da membrana plasmática e de algumas organelas. Além disso, nesse grupo, foi observado que houve uma redução dos parasitas viáveis. Por outro lado, neutrófilos murinos tratados com os inibidores de RIPK1 (NEC-1) e RIPK3 (GSK'872), exibiram integridade da membrana e preservação do conteúdo intracelular. Nesse grupo, os parasitos de *Leishmania* preservaram características morfológicas de viabilidade no interior dos

vacúolos parasitóforos. Essa análise morfológica reforça nossos resultados de inibição farmacológica do eixo RIPK1-RIPK3. Além disso, corrobora com dados anteriores que sugerem a importância da via de morte necroptótica na viabilidade de parasitas de *Leishmania* (FARIAS-LUZ *et al.*, 2016).

O eixo de morte por necroptose demonstrou ter uma grande importância na diminuição da carga parasitária em neutrófilos. Por ser uma morte pró-inflamatória é possível que EROs tenham contribuído para a diminuição da carga parasitária aqui observada. Espécies reativas de oxigênio já demonstraram contribuir para a execução da necroptose (VANDENABEELE *et al.*, 2010) e também com efeito leishmanicida, embora em outro contexto (CARNEIRO *et al.*, 2016). Dados da literatura demonstram que EROs desencadeiam a necroptose promovendo a peroxidação de lipídios, proteínas e DNA, ou como segundos mensageiros nas vias de sinalização dos receptores de morte (CHALLA e CHAN, 2010; VANDENABEELE *et al.*, 2010). No contexto da infecção por *Leishmania*, as EROs também são descritas. O ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) já se mostrou como uma molécula importante no controle da infecção (CARNEIRO *et al.*, 2016; CHANNON *et al.*, 1984). No estudo relacionando a infecção por *Leishmania* em macrófagos, foi encontrado que a replicação do parasito foi controlada através de mecanismos distintos envolvendo NO e IL-1 $\beta$  (FARIAS-LUZ *et al.*, 2016). Aqui, não detectamos IL-1 $\beta$ , descartando a possibilidade de ocorrência de morte celular por piroptose por via canônica, uma vez que esta última vem sendo constantemente associada com IL-1 $\beta$  (GALLUZZI *et al.*, 2018). Neutrófilos, monócitos e macrófagos podem controlar os parasitos pela produção de EROs à partir de estímulos respiratórios após a fagocitose (BRÜNE *et al.*, 2013; GANTT *et al.*, 2001). Nesse estudo, observamos a produção de EROs pelos neutrófilos murinos necroptóticos. Embora não tenhamos avaliado, é provável que o mesmo fenômeno esteja acontecendo em neutrófilos humanos sob o mesmo sistema de inibição de caspases. Além disso, recentemente nosso grupo mostrou que o heme leva à morte celular associada ao estresse oxidativo em neutrófilos humanos infectados por *L. infantum* (QUINTELA-CARVALHO *et al.*, 2017).

O papel dos neutrófilos consiste na erradicação de patógenos (FOX *et al.*, 2010). Entretanto, nas infecções por *Leishmania*, o papel do neutrófilo é controverso. Já foi demonstrado que a apoptose de neutrófilos favorece a infecção por *Leishmania* (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012). Um trabalho do nosso grupo encontrou que a *L. infantum* induz a apoptose em neutrófilos murinos, favorecendo a infecção (PRATES

*et al.*, 2011). No presente estudo, evidenciamos que a possível inibição da apoptose com bloqueio de caspases, desviou a via de morte dos neutrófilos infectados para a necroptose, o que pode estar associado à diminuição da viabilidade dos parasitos. As aplicações práticas desse conhecimento poderiam estar envolvidas em prognósticos e resposta terapêutica utilizando biomarcadores consequentes de vias de morte e inflamação, uma vez que já foi observado altos níveis de LDH em pacientes com LV.

Além disso, já foi demonstrado que elementos da via da necroptose podem ser utilizados como alvos moleculares para intervenções terapêuticas em outras doenças. Estudos mostram que inibidores farmacológicos (GSK2982772) de RIPK1 estão sendo estudados para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais, colite ulcerativa, psoríase, artrite reumatóide entre outras (WEISEL *et al.*, 2017). Estudos recentes trazem novas possibilidades de intervenção dessa via necroptótica. O inibidor de necroptose induzida por TNF- $\alpha$ , NTB451, inibe a necroptose ligando-se a RIPK1 e curiosamente não inibe as vias de sobrevivência e apoptose que também envolvem a RIPK1 (IN *et al.*, 2018). A inibição da necroptose como forma de terapia para a doença Niemann-Pick, combinada com a terapia por 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina também foi descrita (COUGNOUX *et al.*, 2018). Nesse estudo, a necroptose é inibida em camundongos *Knockdown* e *Knockout* para RIPK1 e *Knockout* para RIPK3, sendo mais específico. Além disso, inibidores de MLKL (NSA) têm sido testados como tratamento para lesão renal (JIANG *et al.*, 2018) e intoxicação por mostarda de enxofre (MENACHER *et al.*, 2018). Outras formas de inibição de necroptose também vem sendo estudadas, como o TREM-1 (receptor desencadeante expresso em células mielóides - *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells*), expresso em neutrófilos, macrófagos e em subconjuntos de monócitos, que mostrou atenuar a necroptose induzida por RIPK3 na lesão pulmonar induzida por hiperóxia em camundongos neonatos (SYED *et al.*, 2018). Recentemente, foi demonstrado que *L. infantum* induz a liberação de sTREM-1 (forma solúvel de TREM-1, que parece regular negativamente a sinalização do receptor de TREM-1) nas formas mais graves da LV (BOMFIM *et al.*, 2017). Segundo os autores, isso pode estar acontecendo como uma tentativa de restringir a inflamação excessiva ou esteja sendo induzida pela *L. infantum* para inibir a via inflamatória e contribuir com a doença. Estudos prévios do grupo, investigando o envolvimento da necroptose no controle da infecção causada por diferentes espécies de *Leishmania* indicam que RIPK1 e PGAM5 estão envolvidos no controle da replicação do parasita em macrófagos (FARIAS-LUZ *et al.*, 2016).

Interessantemente, esse evento foi dependente de RIPK1. Nesse contexto, nossos resultados trazem importante contribuição ao evidenciar o envolvimento da necroptose em neutrófilos, pela primeira vez, durante a infecção por *Leishmania*. Inibir a necroptose, no caso de muitas doenças, pode representar uma estratégia terapêutica efetiva, uma vez que se sabe que muitos danos são provocados pelo sistema imunológico reagindo de forma exacerbada e com características inflamatórias prejudiciais ao paciente. Por outro lado, a ocorrência da necroptose tem sido relatada como fator protetor no contexto de algumas infecções (CHAN *et al.*, 2003; CHO *et al.*, 2009; PHILIP *et al.*, 2014).

Esse estudo contribui para um maior conhecimento sobre vias de morte celular em neutrófilos, e como isso pode influenciar na infecção por *L. infantum*. Entretanto, ainda é necessário investigar a fosforilação das moléculas envolvidas na via de morte por necroptose, os mecanismos pelos quais a necroptose reduziu a carga parasitária, e se EROs estão, de fato, envolvidas no controle da viabilidade do parasito. Seria também importante investigar os fatores que contribuem para a indução dessa morte em neutrófilos infectados por *Leishmania*. Tais aspectos se colocam como perspectivas para investigação.

## 6. SUMÁRIO DE RESULTADOS

1. A necroptose induzida pela inibição de caspases, aumentou a atividade inflamatória, observada pelos níveis de LDH e EROs em neutrófilos infectados por *L. infantum*.
2. A inibição de caspase 8 em neutrófilos infectados por *L. infantum* desviou a via de morte celular para a necroptose envolvendo o eixo RIPK1-RIPK3-MLKL.
3. A necroptose de neutrófilos, dependente do eixo RIPK1-RIPK3-MLKL, contribuiu para a diminuição da infecção, reduzindo a viabilidade de parasitas de *L. infantum*.

## 7. CONCLUSÃO

A intervenção no processo de morte por apoptose em neutrófilos pela inibição de caspases, contribui para a eliminação de parasitas de *L. infantum*, provavelmente pelo estímulo de uma resposta inflamatória associada com a necroptose dependente do eixo RIPK1-RIPK3-MLKL.



## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2012.

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. 389–396, 2008. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108018>

ALMEIDA, R. P.; BRITO, J. S.; MACHADO, P. R. Imunoterapia da Leishmaniose Tegumentar Americana American Tegumentary Leishmaniasis. **Immunotherapy**, v. 1, n. 1, p. 83–91, 2005.

ANDERA, L. Signaling activated by the death receptors of the TNFR family. **Biomedical Papers**, v. 153, n. 3, p. 173–180, 2009. <https://doi.org/10.5507/bp.2009.029>

ANDRADE, B. B. *et al.* Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: Current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 122–127, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.01964.x>

APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 87–92, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.009>

ARAÚJO-SANTOS, T. *et al.* Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4334, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04595-8>

ARAÚJO-SANTOS, T. *et al.* *Lutzomyia longipalpis* saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E<sub>2</sub> production in murine macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, 1–9, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000873>

ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, Moscow, v. 69, n. 1, p. 4–9, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:BIRY.0000016344.59411.ee>

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 24–34, 2005.

BADARO, R. *et al.* Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reverses neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 413-418, 1994.

BARBÉ, F. The role of necroptosis in inflammatory bowel diseases (IBD). Department of Microbiology and Immunology, McGill University, p. 11-75, 2015.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300010>

BELIZÁRIO, J. *et al.* Necroptotic cell death signaling and execution pathway: lessons from knockout mice. *Mediators of inflammation*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/128076>

BESTEIRO, S. *et al.* Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063-1075, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.03.008>

BOMFIM, L. G. S. *et al.* *Leishmania infantum* induces the release of sTREM-1 in visceral Leishmaniasis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2265, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02265>

BRÜNE, B. *et al.* Redox control of inflammation in macrophages. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 6, p. 595-637, 2013.

CARNEIRO, P. P. *et al.* The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **PloS one**, v. 11, n. 2, 2016.

CHALLA, S.; CHAN, F. K. M. Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67 n. 19, p. 3241-3253, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0413-8>

CHAN, F. K. M. *et al.* A Role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 51, p. 51613–51621, 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305633200>

CHAN, F. K. M. *et al.* Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. **Annual Review of Immunology**, p. 1–28, 2014. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112248>

CHANNON, J. Y.; ROBERTS, M. B.; BLACKWELL, J. M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, v. 53, n. 2, p. 345–355, 1984.

CHARMOY, M. *et al.* The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by leishmania parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/719361>

CHEN, X. *et al.* Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. **Cell Research**, v. 26, n. 9, p. 1007–1020, 2016. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.100>

CHO, Y. S. *et al.* Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP<sup>3</sup> complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1112–1123, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.037>

CHOI, H. W.; KLESSIG, D. F. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 232, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0921-2>

CHTOUROU, Y. *et al.* Pharmacological Reports Naringenin protects cardiac hypercholesterolemia-induced oxidative stress and subsequent necroptosis in rats. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 6, p. 1090–1097, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.04.002>

CONCEIÇÃO, J. *et al.* Characterization of neutrophil function in human cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–19, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004715>

COSTA, P. L. *et al.* Ecology of Lutzomyia longipalpis in an area of visceral leishmaniasis transmission in north-eastern Brazil. **Acta Tropica**, v. 126, n. 2, p. 99–102, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.01.011>

COUGNOUX, A. *et al.* Necroptosis inhibition as a therapy for Niemann-Pick disease, type C1 : Inhibition of RIP kinases and combination therapy with 2-hydroxypropyl-  $\beta$  – cyclodextrin. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 125, n. 4, p. 345-350, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.10.009>

CUTANEOUS leishmaniasis. **World Health Organization**, 2018. Disponível em: [https://www.who.int/leishmaniasis/cutaneous\\_leishmaniasis/en/](https://www.who.int/leishmaniasis/cutaneous_leishmaniasis/en/). Acesso em: 09 de abril de 2019.

DABOUL, M. W. Role of neutrophils in cutaneous leishmaniasis. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 16, n. 10, p. 1055–1058, 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21222422>

DEGTEREV, A. *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 2, p. 112–119, 2005. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>

DELGADO-RIZO, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps and its implications in inflammation: An overview. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–20, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00081>

DONG, K. *et al.* Necrostatin-1 protects photoreceptors from cell death and improves functional outcome after experimental retinal detachment. **American Journal of Pathology**, v. 181 n. 5, p. 1634–1641, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.029>

DUPREZ, L. *et al.* RIP Kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. **Immunity**, v. 35 n. 6, p. 908–918, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.020>

DWIVEDI, M.; AHNN, J. Autophagy-Is it a preferred route for lifespan extension? **BMB Reports**, v. 42 n. 2, p. 65–71, 2009. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2009.42.2.065>

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35 n. 4, p. 495–516, 2007. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

FALCÃO, S. A. C. *et al.* Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–19, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003601>

FARIAS-LUZ, N. *et al.* *Leishmania braziliensis* subverts necroptosis by modulating RIPK3 Expression. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–6, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02283>

FARIAS-LUZ, N. *et al.* RIPK1 and PGAM5 Control *Leishmania* replication through distinct mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 12, p. 5056–5063, 2016. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502492>

FELTHAM, R.; VINCE, J. E.; LAWLOR, K. E. Caspase-8: not so silently deadly. **Clinical & Translational Immunology**, v. 6, n. 1, p. e124, 2017. <https://doi.org/10.1038/cti.2016.83>

FOX, S. *et al.* Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. **Journal of Innate Immunity**, p. 216–227, 2010. <https://doi.org/10.1159/000284367>

GALLUZZI, L. *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 1, p. 58–73, 2015. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. **Cell Death & Differentiation**, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of regulated necrosis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 35, p. 24–32, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.006>

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Autophagy and innate immunity ally against bacterial invasion. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 16, p. 3213–3214, 2011. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.244>

GANTT, K. R. *et al.* Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 893–901, 2017. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.893>

GARDINASSI, L. G. *et al.* Molecular signatures of neutrophil extracellular traps in human visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 285 p., 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2222-5>

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 3, n. 2, p.43-50, 2015. <https://doi.org/10.1515/jtim-2015-0002>

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338–349, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>

GOTO, H.; PRIANTI, M. D. G. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 241–246, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000500002>

GUEIRARD, P. *et al.* Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 100–111, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01018.x>

GUIMARAES-COSTA, A. B. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900226106>

HE, S. *et al.* Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ . **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1100–1111, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.021>

HUANG, Z. *et al.* Necroptosis in microglia contributes to neuroinflammation and retinal degeneration through TLR4 activation. **Nature Publishing Group**, v. 25, n. 1, p. 180–189, 2017. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.141>

HURRELL, B. P. *et al.* Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392–401, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.003>

HURRELL, B. P. *et al.* Rapid sequestration of *Leishmania mexicana* by neutrophils contributes to the development of chronic lesion. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 5, 2015.

IN, E. *et al.* Identification and characterization of NTB451 as a potential inhibitor of necroptosis. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2884, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23112884>

JIANG, L. *et al.* hsa-miR-500a-3P alleviates kidney injury by targeting MLKL-mediated necroptosis in renal epithelial cells. **Faseb Journal**, v. 33, n. 7, p. 3523-3535, 2019. <https://doi.org/10.1096/fj.201801711R>

- JIAO, Y. *et al.* Frontline Science: Macrophage-derived exosomes promote neutrophil necroptosis following hemorrhagic shock. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 2, p. 175-183, 2018. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0517-173R>
- KAISER, W. J. *et al.* Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 43, p. 31268–31279, 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462341>
- KARPINICH, N. O. *et al.* The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16547–16552, 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110629200>
- KEARNEY, C. J.; MARTIN, S. J. S. J. An inflammatory perspective on necroptosis. **Molecular cell**, v. 65, n. 6, p. 965-973, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.024>
- KENNEDY, A. D.; DELEO, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. **Immunologic research**, v. 43, n. 1-3, p. 25-61, 2009. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8049-6>
- KIM, S. J.; LI, J. Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia. **Cell death & disease**, v. 4, n. 7, p. e716, 2013. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.238>
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598–625, 2005. <https://doi.org/10.1189/jlb.1204697.1>
- KONO, H.; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 4, p. 279–289, 2008. <https://doi.org/10.1038/nri2215>
- KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 789, 2000.
- KUMAR, R. *et al.* Immune checkpoint targets for host-directed therapy to prevent and treat leishmaniasis. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1492, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01492>
- 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, p. 826-835, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.826>
- LEE, S. H. *et al.* Interferon-gamma regulates inflammatory cell death by targeting necroptosis in experimental autoimmune arthritis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2–10, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09767-0>
- LEEPER, N. J. The Role of Necroptosis in Atherosclerotic Disease. **JACC: Basic to Translational Science**, v. 1, n. 6, p. 548–550, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.08.002>

- LIM, S. Y. *et al.* The cardioprotective effect of necrostatin requires the cyclophilin-D component of the mitochondrial permeability transition pore. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 21, n. 6, p. 467–469, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10557-007-6067-6>.
- LINKERMANN, A. *et al.* Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110 n. 29, p. 12024–12029, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305538110>.
- LUEDDE, M. *et al.* RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, v. 103, n. 2, p. 206–216, 2014. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu146>
- LYON, C. B. *et al.* Review roles of caspases in necrotic cell death (Figure 1). **Cell**, v. 167, n. 7, p. 1693–1704, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.047>
- MARSDEN, P. D. Mucosal Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L (V)b in Três Braços, Bahia-Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 2, p. 93–101, 1994.
- MCFARLANE, E. *et al.* Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**, v. 76, n. 2, p. 532-541, 2008. <https://doi.org/10.1128/IAI.01388-07>
- MENACHER, G. *et al.* Necrosulfonamide—Unexpected effect in the course of a sulfur mustard intoxication. **Chemico-biological interactions**, v. 298, p. 80-85, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.10.030>
- MIHALACHE, C. C. *et al.* Inflammation-associated autophagy-related programmed necrotic death of human neutrophils characterized by organelle fusion events. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 11, p. 6532-6542, 2011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1004055>
- MIHALY, S. R. *et al.* Noncanonical cell death program independent of caspase activation cascade and necroptotic modules is elicited by loss of TGF $\beta$ -activated kinase 1. **Scientific Reports**, v. 7, n.1, p. 1–12, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03112-1>
- MOCARSKI, E. S.; GUO, H.; KAISER, W. J. Necroptosis: The Trojan horse in cell autonomous antiviral host defense. **Virology**, p. 479–480 e 160–166, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.016>
- MORENO-GONZALEZ, G.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, D. V. Necroptosis: A novel cell death modality and its potential relevance for critical care medicine. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 194, n. 4, p. 415–428, 2016. <https://doi.org/10.1164/rccm.201510-2106CI>
- MORIWAKI, K.; CHAN, F. K. M. RIP3: A molecular switch for necrosis and inflammation. **Genes and Development**, v. 27, n. 15, p. 1640–1649, 2013. <https://doi.org/10.1101/gad.223321.113>

MURROW, L.; DEBNATH, J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 8, p. 105-137, 2013. <https://doi.org/10.1002/hep.26200>.Absence

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173–182, 2006. <https://doi.org/10.1038/nri1785>

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: An integrated view. **Immunological Reviews**, v. 219, n. 1, p. 88–102, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x>

NOORDEN, C. J. F. V. Editorial: The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. **Acta Histochemica**, v. 103, n. 3, p. 241-251, aug. 2001. <https://sci-hub.tw/10.1078/0065-1281-00601>.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378-384, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.07.004>

OERLEMANS, M. I. F. J. *et al.* Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia–reperfusion in vivo. **Basic Research in Cardiology**, v. 107, n. 4, p. 270, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0270-8>

OPFERMAN, J. T. Apoptosis in the development of the immune system. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n.2, p. 234–242, 2008. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402182>

PAN, G. *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. **Science**, v. 277, n. 5327, p. 815-818, 1997a. <https://doi.org/10.1126/science.277.5327.815>

PAN, G. *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 111-113, 1997b. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.111>

PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 311–320, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature14191>

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Immunology**, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 1981.

PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in *Leishmaniasis* transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2009. <https://doi.org/10.1126/science.1159194>

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 1289–1299, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01355.x>



PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the trans. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 1, p. 1–6, 2014. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>

PHILIP, N. H. *et al.* Caspase-8 mediates caspase-1 processing and innate immune defense in response to bacterial blockade of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 20, p. 7385-7390, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403252111>

PRATES, D. B. *et al.* Lutzomyia longipalpis saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 3, p. 575–582, 2011. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211105>

QING, D. Y. *et al.* Red blood cells induce necroptosis of lung endothelial cells and increase susceptibility to lung inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, n. 11, p. 1243–1254, 2014. <https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1095OC>

QUEIROZ SAMPAIO, M. J. A. *et al.* Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 11, p. e877, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000877>

QUINN, M. T.; AMMONS, M. C. B.; DELEO, F. R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clinical Science**, v. 111, n. 1, p. 1–20, 2006. <https://doi.org/10.1042/CS20060059>

QUINTELA-CARVALHO, G. *et al.* Heme drives oxidative stress-associated cell death in human neutrophils infected with Leishmania infantum. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1620, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01620>

REMIJSEN, Q. *et al.* Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 1, p. e1004, 2014. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.531>

RIBEIRO-GOMES, F.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 59, 2012. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00059>

ROUSSEAU, D. *et al.* In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in Leishmania infantum infection. **BMC Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17, 2001. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-1-17>

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 453-483, 2001.

SATO, K. *et al.* Receptor interacting protein kinase-mediated necrosis contributes to cone and rod photoreceptor degeneration in the retina lacking interphotoreceptor retinoid-binding protein. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 44, p. 17458-17468,

2013. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1380-13.2013>

SCHREIBER, A. *et al.* Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 45, p. E9618–E9625, 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708247114>

SHARMA, S. *et al.* A subset of neutrophils expressing markers of antigen-presenting cells in human visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n.10, p. 1531–1538, 2016. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw394>

SILKE, J.; RICKARD, J. A.; GERLIC, M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. **Nature Immunology**, v. 16, n. 7, p. 689, 2015. <https://doi.org/10.1038/ni.3206>

SILVA, F. *et al.* Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n.1, p.94–98, 2005.

SMITH, C. C. T. *et al.* Necrostatin: A potentially novel cardioprotective agent? **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 21, n. 4, p. 227–233, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10557-007-6035-1>

SPIEGEL, A. *et al.* Neutrophils suppress intraluminal NK cell–mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells. **Cancer Discovery**, v. 6, n. 6, p. 630–649, 2016. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1157>

SUN, L. *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. **Cell**, v. 148, p. 1–2 e 213–227, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031>

SYED, M. A. *et al.* TREM-1 Attenuates RIPK3-mediated necroptosis in hyperoxia-induced lung injury in neonatal mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 60, n. 3, p. 308–322, 2019. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0219OC>

TAKEMOTO, K. *et al.* Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 777–787, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.08.007>

TAVARES, N. *et al.* Degranulating neutrophils promote leukotriene B4 production by infected macrophages to kill *Leishmania amazonensis* parasites. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 4, p. 1865–1873, 2016. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502224>

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. 656–666, 2014. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu158>

- TEIXEIRA, C. *et al.* Lutzomyia longipalpis Saliva Drives Interleukin interleukin-17-induced Neutrophil Recruitment favoring Leishmania infantum Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 881, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00881>
- THALHOFER, C. J. *et al.* Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan leishmania infantum chagasi. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 108–117, 2011. <https://doi.org/10.1128/IAI.00338-10>
- TRICHONAS, G. *et al.* Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 50, p. 21695–21700, 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009179107>
- Unveiling the neglect of leishmaniasis. **World Health Organization**, 2017. Disponível em: [https://www.who.int/leishmaniasis/Unveiling\\_the\\_neglect\\_of\\_leishmaniasis\\_infographic.pdf](https://www.who.int/leishmaniasis/Unveiling_the_neglect_of_leishmaniasis_infographic.pdf). Acesso em: 09 abr. 2019.
- VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6521>
- VANDENABEELE, P., *et al.* Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 10, p. 700–715, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrm2970>
- VAUX, D. L.; KORSMEYER, S. J. Cell death in development. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 245-254, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80564-4)
- WANG, H. *et al.* Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. **Molecular Cell**, v. 54, n. 1, p. 133-146, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.003>
- WANG, X. *et al.* Neutrophil necroptosis is triggered by ligation of adhesion molecules following GM-CSF priming. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 10, p. 4090-4100, 2016. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600051>
- WEISEL, K. *et al.* Randomized clinical study of safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of RIPK1 inhibitor GSK2982772 in healthy volunteers. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 5, n. 6, 2017. <https://doi.org/10.1002/prp2.365>
- WERNECK, G. L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n.6, p. 1–2, 2016. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00ED010616>
- WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644–645, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2010000400001>

WHO. World Health Organization. Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. **Weekly Epidemiological Record**, v. 92, n. 38, p. 557–572, 2017. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-2-15>. Voir

WU, J. *et al.* Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis. **Cell Research**, v. 23, n. 8, p. 994–1006, 2013. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.91>

WU, W.; LIU, P.; LI, J. Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 82, n. 3, p. 249–258, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.08.004>

WU, Y. T. *et al.* Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death. **Autophagy**, v. 4, n. 4, p. 457–466, 2008. <https://doi.org/10.4161/auto.5662>

WU, Y. T. *et al.* ZVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNF $\alpha$  mediated by the PKC-MAPKs-AP-1 pathway. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 1, p. 26–37, 2011. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.72>

XIA, B. *et al.* MLKL forms cation channels. **Nature Publishing Group**, v. 26, n. 5, p. 517–528, 2016. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.26>

XU, X. *et al.* Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury. **Brain Research**, v. 1355, p. 189–194, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.080>

YAN, Y.; BACKER, J. M. Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. **Biochemical Society Transactions**, v. 35 (Pt 2), p. 239–241, 2007. <https://doi.org/10.1042/BST0350239>

YANG, S. *et al.* Nec-1 alleviates cognitive impairment with reduction of A $\beta$  and tau abnormalities in APP/PS1 mice. **EMBO Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 61–77, 2017. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606566>

YIZENGAW, E. *et al.* Visceral leishmaniasis patients display altered composition and maturity of neutrophils as well as impaired neutrophil effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1–12, 2016. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00517>

ZHANG, Y., *et al.* Plasma membrane changes during programmed cell deaths. **Cell Research**, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.133>

ZHOU, W; YUAN, J. Necroptosis in health and diseases. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**, p. 14-23, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.07.013>

## ANEXO

**Anexo 1.** Inibidores de caspases e de moléculas da via necroptótica não interferem na viabilidade de *L. infantum* in vitro.

