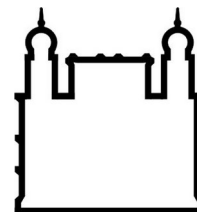




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

Avaliação dos mecanismos de controle da
infecção por *Leishmania amazonensis* em
neutrófilos humanos: o papel do LTB₄.

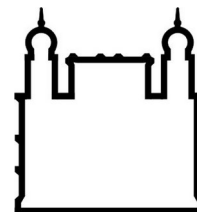
Natalia Machado Tavares

Salvador, Bahia, Brasil
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

Avaliação dos mecanismos de controle da
infecção por *Leishmania amazonensis* em
neutrófilos humanos: o papel do LTB₄.

Natalia Machado Tavares

Orientadora: Dra. Cláudia Brodskyn
Co-orientadora: Dra. Valéria Borges

Salvador, Bahia, Brasil
2013

DEDICATÓRIA

**Àqueles que me movem,
que me fazem querer ser uma pessoa melhor a cada dia:
Angela, Américo, Bruno e Rafael.**

AGRADECIMENTOS

À esse Universo Infinito, por nos permitir colher o que plantamos;

Aos meus pais, Angela e Américo, ao meu irmão Bruno, e à minha outra metade, Rafael, pelo amor e apoio incondicionais;

À minha orientadora, Dr^a Cláudia Brodskyn, pela confiança nesses 8 anos de convivência com muita dedicação, comprometimento, além da participação na minha formação científica e pessoal;

À minha co-orientadora, Dr^a Valéria Borges, que nos trouxe muitos ensinamentos e entusiasmos;

Aos voluntários que doaram um pouco de si para este estudo;

Aos colegas Théo e Lilian que foram fundamentais na bancada, mas principalmente nas sugestões e discussões de resultados;

Aos nossos colaboradores externos, Dr^a Patrícia Bozza, Dr. Rodrigo Soares e Dr. Ulisses Lopes pela valiosa contribuição e ricas sugestões;

À Felipe, Martha e Grazielle pela pronta disponibilidade em colaborar e compartilhar;

Aos demais membros da Equipe Cláudia, Claire, Melissa, Laís e Jurema que fazem da bancada um ambiente de trabalho muito agradável;

Aos demais pesquisadores do LIMI-LIP, Dr. Manoel Barral-Netto, Dr^a Aldina Barral, Dr^a Theolis Barbosa, Dr. Jorge Clarêncio, Dr. Johan van WeyeBergh, Dr^a Camila Indiani, pelas valiosas contribuições e pelo ambiente de aprendizado que nos proporcionam;

Aos técnicos e secretárias do LIMI-LIP, sempre muito eficientes e prestativos;

Ao CPqGM, pela disponibilização de excelente infra-estrutura, e todos os seus funcionários, em especial aos professores e Coordenação de Ensino e Biblioteca;

Aos demais colegas e amigos do LIMI-LIP;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

Àqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão deste estudo.

Figura 1. Análise entre microscopia ótica (MO) e citometria de fluxo (FACS) para determinar a taxa de infecção de neutrófilos humanos com *Leishmania amazonensis*-GFP.

Figura 2. Infecção por *L. amazonensis*-GFP induz expressão de marcadores de superfície e produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) em neutrófilos humanos.

Figura 3. Infecção de neutrófilos humanos com *L. amazonensis* induz produção de quimiocinas e migração de diferentes leucócitos.

Figura 4. *L. amazonensis* e seu LPG induzem produção de mediadores lipídicos e degradação em neutrófilos humanos.

Figura 5. TLR2 participa na fagocitose de *L. amazonensis*-GFP por neutrófilos humanos.

Figura 6. A expressão de TLR2 em neutrófilos humanos, na presença de *L. amazonensis*-GFP, é parcialmente dependente de LTB4 e medeia a fagocitose do parasito.

Figura 7. Inibição farmacológica de mediadores, como LTB4, MMP-9 e MPO, reduzem a capacidade de neutrófilos humanos em controlar a infecção por *L. amazonensis*.

Figura 8. Os mecanismos de degranulação e controle da infecção por *L. amazonensis* são dependentes de LTB4 em neutrófilos humanos.

Figura 9. TLR2 participa na atividade leishmanicida de neutrófilos humanos, bem como na sinalização via NFκB.

Figura 10. Liberação de mediadores responsáveis pela atividade leishmanicida de neutrófilos humanos é mediada por sinalização via NFκB.

Figura 11. As vias de sinalização PI3k, MEK e PKC participam no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos.

Figura 12. As vias de sinalização PI3k, MEK e PKC participam no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos induzindo degranulação mediada por LTB₄.

Figura 13. A atividade leishmanicida de neutrófilos humanos dependente de LTB₄ é mediada por PPARα.

Figura 14. Modelo proposto para o mecanismo de ação do LTB₄ em neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA Análise de Variância

BLT Receptores do Leucotrieno B 4, do inglês *Leukotriene B 4 Receptor*

CBA Ensaio de Citometria com Esferas, do inglês *Cytometric Bead Array*

CCL3, 4 Quimiocina Ligante 3, 4, do inglês *Chemokine (C-C motif) Ligand 3, 4*

ELISA Ensaio Imunoenzimático, do inglês *Enzyme Liked Immunosorbent Assay*

IFN Interferon

IL-8 Interleucina 8

LPS Lipopolissacarídeo

LTB4 Leucotrieno 4

MMP-9 Metaloproteinase 9

MPO Mieloperoxidase

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo P

NE Elastase Neutrófila, do inglês *Neutrophil Elastase*

PGE2 Prostaglandina E 2

PKC Proteína Cinase C, do inglês *Protein Kinase C*

PI3k Fosfoinosítido 3 Cinase, do inglês *Phosphoinositide 3-kinase*

PPAR α Receptor Ativado da Proliferação do Peroxissomo, do inglês *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α*

ROS Espécies Reativas do Oxigênio, do inglês *Reactive Oxygen Species*

SBF Soro Bovino Fetal

TGF- β Fator Transformador de Crescimento β , do inglês *Transforming Growth Factor β*

Th Célula Auxiliadora, do inglês T helper

TLR Receptor do Tipo Toll, do inglês Toll-like Receptor

TNF Fator de Necrose Tumoral

ÍNDICE

RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
Leishmanioses	14
Neutrófilos: características gerais, recrutamento e ativação	16
Neutrófilos e mecanismos microbicidas	19
Interação entre neutrófilos e <i>Leishmania</i>	21
Fagocitose: um processo mediado por receptores	23
Neutrófilos e mediadores lipídicos	25
JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	30
OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	31
DESENHOS EXPERIMENTAIS	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
Separação e cultura de células	36
Parasitas e infecção	37
Caracterização fenotípica e funcional dos neutrófilos cultivados com <i>L. amazonensis</i>	31
Inibição de mediadores e vias de sinalização intracelular	39
Viabilidade de parasitas	40
Extração e purificação do lipofosfoglicano (LPG)	40
Microscopia eletrônica de transmissão	40
Análise estatística	41
RESULTADOS	42

Comparação da eficiência entre microscopia ótica e citometria de fluxo para análise da taxa de infecção por <i>L. amazonensis</i> em neutrófilos humanos	42
Avaliação da expressão de marcadores de superfície e produção de ROS por neutrófilos humanos infectados com <i>L. amazonensis</i> -GFP	44
Quantificação da produção de quimiocinas e capacidade de induzir migração de leucócitos em sobrenadante de cultura de neutrófilos humanos infectados com <i>L. amazonensis</i>	46
Avaliação da produção de mediadores lipídicos e degranulação de neutrófilos humanos infectados com <i>L. amazonensis</i>	48
Avaliação da expressão de TLR2 e TLR4 em neutrófilos humanos infectados com <i>L. amazonensis</i> -GFP	50
Identificação de moléculas e enzimas neutrófilos responsáveis pelo controle da infecção por <i>L. amazonensis</i>	53
Avaliação do papel do LTB ₄ na degranulação e controle da infecção por <i>L. amazonensis</i> em neutrófilos humanos	54
Avaliação das vias intracelulares de sinalização responsáveis pelo controle da infecção da infecção por <i>L. amazonensis</i> em neutrófilos humanos	56
Identificação do receptor de LTB ₄ responsável pela indução da atividade leishmanicida em neutrófilos infectados com <i>L. amazonensis</i>	62
Proposição de modelo representativo para o mecanismo de ação do LTB ₄ no controle da infecção por <i>L. amazonensis</i> em neutrófilos humanos	64
DISCUSSÃO	66
CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
PUBLICAÇÕES RELACIONADAS AO DOUTORADO	86

1. RESUMO

As Leishmanioses compõem um complexo de doenças causadas pelo parasito protozoário do gênero *Leishmania*. Os neutrófilos são rapidamente recrutados para o local da infecção, capturando parasitos na pele, e são a principal fonte de leucotrieno B₄ (LTB₄), um mediador lipídico pró-inflamatório. Porém, o papel do LTB₄ no controle da infecção por *Leishmania amazonensis* em neutrófilos humanos tem sido pouco investigado. Neste estudo, foi demonstrado que *L. amazonensis* ou seu lipofosfoglicano (LPG) induziram ativação dos neutrófilos com liberação dos conteúdos granulares e produção de LTB₄. Observamos também que este mediador lipídico está envolvido na eliminação de *Leishmania* dentro do neutrófilo por regular a degranulação e produção de radicais livres de oxigênio (ROS). A infecção por *L. amazonensis* também induziu um rápido aumento na expressão de TLR2 e TLR4. Porém, apenas TLR2 é internalizado após 3 horas e sua expressão é parcialmente dependente de LTB₄. Zileuton, o inibidor farmacológico da 5-lipoxigenase (5-LO), e portanto, inibidor da produção de LTB₄, reduziu a capacidade leishmanicida e fagocitose dos neutrófilos. Também demonstramos que NFκB é a principal cascata de sinalização responsável pelo mecanismo leishmanicida induzido por LTB₄. Tais mecanismos induzidos por LTB₄ são, provavelmente, mediados pelo seu receptor endógeno, PPARα. Estes achados revelam o papel essencial do LTB₄ na regulação da fagocitose de *L. amazonensis* por neutrófilos humanos pela internalização de TLR2. Esta via leva à eliminação da *L. amazonensis* por mecanismos dependentes de LTB₄.

Palavras-chave: neutrófilos humanos, *Leishmania amazonensis* e leucotrieno B₄.

2. ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of diseases caused by a protozoan parasite from the *Leishmania* genus. Neutrophils are rapidly recruited to the site of *Leishmania* infection and play an active role by capturing parasites in the skin. They are known as the main source of leukotriene B₄ (LTB₄), a potent pro-inflammatory lipid mediator. However, the role of LTB₄ in the control of *Leishmania amazonensis* infection by human neutrophils has not yet been investigated. In this study, we demonstrated that *L. amazonensis* or its lipophosphoglycan (LPG) induced neutrophil activation with release of granules content and LTB₄ production. We found that this lipid mediator is involved in *Leishmania* killing inside the neutrophil through the regulation of enzymes granules release and ROS production. *L. amazonensis* infection also induced a rapid increase of TLR2 and TLR4 expression. However, only TLR2 is internalized at later time point and its expression is partially LTB₄-dependent. Zileuton, the pharmacological inhibitor of 5-lipoxygenase (5-LO) and therefore, inhibitor of LTB₄ production, decreased killing ability and phagocytosis in *L. amazonensis*-infected neutrophil. We confirmed that NFκB is the main signaling cascade responsible for the leishmanicidal mechanism induced by LTB₄. These effectors mechanisms triggered by LTB₄ are probably mediated through its endogenous receptor, PPARα. Our findings reveal the essential role of LTB₄ in regulating *L. amazonensis* phagocytosis by human neutrophils through TLR2 internalization. This pathway leads to *L. amazonensis* elimination also by LTB₄-dependent mechanisms.

3. INTRODUÇÃO

3.1 Leishmanioses

As leishmanioses compõem um complexo de doenças que representam um importante problema de saúde pública em mais de 80 países das Américas do Sul e Central, África e Ásia, com mais de 2 milhões de novos casos por ano (DESJEUX, 2004). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem sob o risco de infecção, 12 milhões de pessoas encontram-se infectadas e 57 mil mortes ocorrem a cada ano devido às leishmanioses (WHO, 2002).

O parasito protozoário do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae) é o agente etiológico que causa um amplo espectro de manifestações clínicas, desde uma lesão cutânea única até a forma visceral. A transmissão dos parasitos se dá através da picada do flebótomo vetor infectado. No Brasil, os flebotomíneos responsáveis pela transmissão da *Leishmania* pertencem ao gênero *Lutzomyia* (Ordem Diptera, Família Psychodidae), cujas fêmeas são hematófagas. Durante o repasto sanguíneo, as formas promastigotas do parasito são inoculadas na derme do hospedeiro vertebrado junto com a saliva do vetor. Estes parasitos são, então, internalizados por fagócitos e transformam-se em amastigotas, que são capazes de sobreviver dentro do vacúolo parasitóforo. Neste ambiente, as formas amastigotas multiplicam-se por divisão binária, resistindo aos mecanismos microbicidas dos fagócitos, principalmente macrófagos. Eventualmente, as células infectadas se rompem, liberando as amastigotas que podem infectar novas células. Durante um novo repasto sanguíneo, o flebótomo ingere células infectadas. Uma vez no interior do trato digestivo do vetor, as amastigotas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas.

A leishmaniose se manifesta através de duas formas clínicas principais: a forma cutânea ou tegumentar e a forma visceral. A leishmaniose cutânea ou tegumentar (LT) é caracterizada pela formação de úlceras na pele, que apresentam tipicamente bordas elevadas e fundo necrótico. Embora a LT comprometa primariamente a pele, a linfadenopatia regional é comum, podendo preceder o aparecimento da lesão (BARRAL *et al.*, 1995). Nas Américas, a LT é causada por espécies como *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Vianna) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (Laison *et al.*, 1987). No Velho Mundo, as espécies responsáveis pela LT são *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica*.

A LT pode se manifestar como uma úlcera cutânea única e, neste caso, é chamada de leishmaniose cutânea localizada (LCL) ou por diversas lesões nodulares não ulceradas, sendo neste caso, leishmaniose cutânea difusa (LCD) (CARVALHO *et al.*, 1994). Nas Américas, aproximadamente 3% dos pacientes são acometidos pela leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) (BARRAL *et al.*, 1995), que é uma complicação decorrente da metástase de parasitos para regiões como nariz, faringe, boca e laringe (MARSDEN, 1986).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é causada pela *L. chagasi-infantum* e resulta da incapacidade do sistema imune em impedir a multiplicação do parasito (STÄGER *et al.*, 2010), levando à disseminação hematogênica. Isto leva ao desenvolvimento de uma enfermidade infecciosa crônica que pode causar um estado de debilidade progressivo e óbito se não-tratada.

No Brasil foram registrados casos de leishmanioses em todos os estados do país, com relatos de LT em 2.302 municípios (Ministério da Saúde, 2004). Entre os anos de 2000 e 2002, ocorreram 100.296 novos casos confirmados dessa doença, causados principalmente pela *L. (L.) amazonensis* (Ministério da Saúde, 2005). Esta espécie é de alta relevância por ser o agente etiológico envolvido em todas as manifestações clínicas da LT (GRIMALDI *et al.*, 1987). A região Nordeste é a mais afetada pela LT com 37,1% das notificações do país entre 1997 e 2002, sendo o Maranhão com o maior número de casos.

3.2 Neutrófilos: características gerais, recrutamento e ativação

Relatos na literatura demonstram que neutrófilos são rapidamente recrutados para o local de inoculação de *Leishmania* e avidamente fagocitam parasitas (PETERS *et al.*, 2008; RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012). No entanto, já foi demonstrado que *L. major* é capaz de sobreviver no interior dos fagossomos de neutrófilos e, uma vez que estas células entram em apoptose, elas se tornam alvos fagocíticos para macrófagos. Nesse sentido, os parasitos são eficientemente transmitidos para os fagossomos de macrófagos (LASKAY *et al.*, 2003). A utilização de tecnologias, como imagens intravitalis, permitiu a demonstração da rapidez com que neutrófilos migram para o local de inoculo da *L. major* após a transmissão. Diante disso, estas observações sugerem que neutrófilos são um dos principais hospedeiros de *L. major* nos momentos iniciais da infecção *in vivo* (PETERS *et al.*, 2008). Os promastigotas internalizados por neutrófilos são direcionados para lisossomos e eliminados como resultado de respostas microbicidas e/ou de restrição nutricional (GUEIRARD *et al.*, 2008; RUBIN-BEJERANO *et al.*, 2003).

Os neutrófilos compõem a família de granulócitos das células brancas do sangue, cuja principal característica é a presença de grânulos no seu citoplasma e o núcleo multilobulado. Tais grânulos são estruturas de armazenamento únicas e importantes para as funções microbicidas dos neutrófilos. São componentes cruciais da resposta imune inata, com um curto período de vida (2 a 8 horas) e altamente diferenciadas. São originados na medula óssea, onde são produzidos cerca de 10^{11} neutrófilos diariamente. Este número pode aumentar para 10^{12} com inflamação aguda e representa 70% da população de leucócitos circulantes (AMULIC *et al.*, 2011; LASKAY *et al.*, 2008).

Os grânulos típicos dos neutrófilos são classificados em 3 tipos, de acordo com seu conteúdo: azurofílicos, específicos ou terciários. Estes grânulos são formados através de um processo contínuo, onde vesículas brotam do Complexo de Golgi e se fundem, adquirindo estrutura granular. O conteúdo dessas estruturas é

determinado pelo programa de transcrição protéica ativo no momento da sua formação. Uma vez que a maturação do neutrófilo altera seqüencialmente seu perfil transcricional, o conteúdo dos grânulos muda (BORREGAARD & COWLAND, 1997). Os grânulos azurofílicos, também chamados de mieloperoxidase (MPO)-positivos ou primários, são os maiores e os primeiros a serem formados durante a maturação dos neutrófilos. Além do MPO, enzima crucial para a formação do ácido hipocloroso (LACY, 2005), estes grânulos possuem defensinas, lisozimas e serino-proteases como elastase neutrofílica (NE), proteinase 3 (PR3) e catepsina G (CG) (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003). A segunda classe de grânulos, os específicos, também chamados de secundários, são menores e formados após os primários. Eles não contêm MPO e são caracterizados pela presença da glicoproteína lactoferrina (BORREGAARD, 2010; LACY, 2005). Por fim, os últimos grânulos a serem formados são os terciários, de menor tamanho e que armazenam metaloproteases, como gelatinase (BORREGAARD, 2010).

Além dos grânulos, os neutrófilos possuem outra estrutura de armazenamento denominada vesícula secretória. Diferentemente dos grânulos clássicos, estas estruturas não brotam do Golgi, mas são resultado de endocitose nos momentos finais da maturação dos neutrófilos (BORREGAARD, 2007). Conseqüentemente, seu conteúdo consiste predominantemente de proteínas plasmáticas, como albumina. Além disso, a membrana das vesículas secretórias servem como reservatório de moléculas importantes para a migração dos neutrófilos.

Os neutrófilos atuam na primeira linha de defesa contra infecções e estão envolvidos na destruição de microorganismos (ZYCHLINSKY et al., 2003). Para essa finalidade, os neutrófilos dispõem de uma variedade de ferramentas microbicidas que podem ser prejudiciais também para próprias células. Por isso, a utilização desses mecanismos é altamente regulada e localizada. Esse processo de ativação tem início quando, numa infecção, as células endoteliais são estimuladas por sinais derivados de patógenos ou inflamatórios. Estes sinais induzem as células endoteliais

a expressarem moléculas de adesão, como selectinas e integrinas, na sua porção voltada para o lúmen do vaso (BORREGAARD, 2010). Os neutrófilos expressam, de modo constitutivo, selectinas, como CD62L, essenciais para o reconhecimento de sinais inflamatórios nas células endoteliais (KANSAS, 1996; MCEVER & CUMMINGS, 1997). Esta interação entre selectinas é de baixa afinidade caracterizando o rolamento de neutrófilos sobre a parede do vaso, mas é suficiente para ativar uma variedade de cinases, como a PI3k (LEY *et al.*, 2007; MUELLER *et al.*, 2010). Estes sinais iniciam uma série de mudanças na biologia do neutrófilo e ativação de integrinas, responsáveis pela adesão firme ao endotélio, mediada principalmente por Mac-1 (CAMPBELL *et al.*, 1998; CONSTANTIN *et al.*, 2000; LEY *et al.*, 2007). Firmemente aderido, o neutrófilo inicia a transmigração através do endotélio e membrana basal (LEY *et al.*, 2007), composta principalmente por laminina e colágeno. Proteases presentes nos grânulos terciários devem auxiliar neste processo através da digestão das proteínas que compõem essa barreira.

Uma vez no espaço intersticial, o neutrófilo segue, através de gradiente quimiotático, na direção do local de inflamação. A ligação destes quimio-atraentes em seus receptores na superfície dos neutrófilos, inicia cascatas intracelulares de sinalização, como MAP/ERK (SELVATICI *et al.*, 2006; ZARBOCK & LEY, 2008). Estas vias terminam por induzir a organização dos componentes do complexo NADPH oxidase, responsável pela explosão respiratória, característica típica de ativação dos neutrófilos. Ao mesmo tempo, a família de receptores de padrões moleculares associados a patógenos (PRR), principalmente receptores do tipo Toll (TLR), é ativada (SABROE *et al.*, 2005). Em neutrófilos, todos os TLR são constitutivamente expressos, com exceção do TLR3, e sua estimulação contribui para ativação, como por exemplo, induzindo a explosão respiratória (PARKER *et al.*, 2005; SABROE *et al.*, 2005). Por fim, ao atingir o ponto de maior concentração da substância quimiotática, o neutrófilo inicia o processo final de liberação de moléculas microbicidas.

3.3 Neutrófilos: degranulação e mecanismos microbicidas

A principal função dos neutrófilos é a fagocitose e destruição de microorganismos. São dois os principais mecanismos responsáveis pela eliminação de patógenos: a explosão respiratória, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e a degranulação, liberando enzimas microbicidas armazenadas em seus grânulos (KENNEDY & DELEO, 2009).

À medida que o neutrófilo é ativado, os grânulos são mobilizados e fundem com o fagossomo ou com a membrana plasmática (BORREGAARD & COWLAND, 1997). As diferentes classes de grânulos possuem propensão variada para mobilização em resposta a estímulos inflamatórios: os grânulos primários são os mais difíceis de mobilizar, seguidos pelos secundários, terciários e, por fim, as vesículas secretórias são as de mais fácil mobilização (BORREGAARD, N *et al.*, 1994; KJELDSEN *et al.*, 1992; SENDELØV *et al.*, 1993). O contato do neutrófilo com o endotélio através da interação entre selectinas, induz mobilização das vesículas secretórias, cuja membrana é rica em fatores cruciais para a continuação da ativação, como a integrina Mac-1 (BORREGAARD *et al.*, 1994; BORREGAARD, 2010; SENDELØV *et al.*, 1993). A fusão de vesículas secretórias com a membrana plasmática expõe esses componentes ao ambiente externo e resulta na firme adesão do neutrófilo ao endotélio mediada por integrinas. Através do endotélio, o neutrófilo inicia a mobilização dos grânulos terciários, liberando metaloproteases. A atividade dessas proteases auxilia o neutrófilo a atravessar a membrana basal (DELCLAUX *et al.*, 1996). No local de inflamação, ocorre a ativação completa do neutrófilo, iniciando a explosão respiratória e mobilização dos grânulos secundários e primários. Estes grânulos fundem com o fagossomo, contribuindo com as atividades microbicidas deste compartimento, ou fundem com a membrana plasmática, liberando suas moléculas microbicidas no tecido.

Os neutrófilos produzem uma gama de peptídeos e proteínas que direta ou indiretamente eliminam microorganismos. Existem três tipos principais de

microbicidas utilizados por neutrófilos. O primeiro deles são peptídeos e proteínas que se ligam à membrana de microorganismos, como as α -defensinas (SCHROEDER *et al.*, 2011). A segunda classe é composta por enzimas proteolíticas que participam na eliminação de microorganismos, como a NE, que cliva fatores de virulência (WEINRAUCH *et al.*, 2002). A última classe de microbicidas em neutrófilos são proteínas quelantes de metais essenciais para microorganismos, que provavelmente impedem seu crescimento (BROGDEN, 2005). A lactoferrina se liga preferencialmente ao ferro e a calprotectina seqüestra o zinco, que resulta em “imunidade nutricional” (CORBIN *et al.*, 2008).

Alem da degranulação, os neutrófilos produzem ROS através da explosão respiratória que participa na eliminação de microorganismos (HAMPTON *et al.*, 1998). O complexo NADPH oxidase se agrupa nas membranas plasmática e do fagossomo e inicia a cascata de reativos do oxigênio pela redução de oxigênio molecular em superóxido. Este último é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio. Com a degranulação, o MPO reage com o peróxido de hidrogênio produzindo várias espécies reativas, dentre elas o ácido hipocloroso. Considerado o principal produto da MPO, o ácido hipocloroso é mais reativo do que o superóxido e tem, portanto, efeitos microbicidas diretos no fagossomo (HAMPTON *et al.*, 1998; WINTERBOURN, 2008).

Todos estes mecanismos microbicidas não são danosos apenas para os microorganismos, mas também para as células do hospedeiro. Portanto, os neutrófilos devem ser removidos do tecido antes de causarem efeitos lesivos no local da inflamação. A apoptose é um aspecto fundamental na resolução da inflamação, caracterizada pela redução nas funções celulares e capacidade inflamatória (KOBAYASHI *et al.*, 2005; WHYTE *et al.*, 1993). Uma vez que os neutrófilos executaram seu papel microbicida, eles sofrem morte celular programada, que não apenas reduz o número de neutrófilos no tecido, como também produz sinais que inibem o recrutamento de mais células (AMULIC *et al.*, 2011). A apoptose de neutrófilos pode ser iniciada por estímulos da via extrínseca

(extracelular), como TNF- α ou ligante do FAS, ou pela via intrínseca (intracelular) mediada pela mitocôndria. É um processo não-inflamatório que leva à perda dos grânulos citoplasmáticos, arredondamento do núcleo e condensação da cromatina (SAVILL & FADOK, 2000).

As vias de sinalização envolvidas na sobrevivência ou morte celular são controladas pela expressão de proteínas anti-apoptóticas, como Mcl-1 e A1, ou pró-apoptóticas, como Bad, Bax, Bak e Bid, além da ativação de caspases (KENNEDY & DELEO, 2009). Igualmente importante para a resolução da inflamação é a remoção dessas células apoptóticas. Nos momentos iniciais da morte celular, sinais de “encontre-me” são liberados, atraindo fagócitos. Em seguida, sinais de fagocitose são necessários para o reconhecimento específico de células apoptóticas. Por fim, a fagocitose de células apoptóticas induz a produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10 (AMULIC *et al.*, 2011; KENNEDY & DELEO, 2009).

3.4 Interação entre neutrófilos e *Leishmania*

Os neutrófilos estão entre as primeiras células que chegam em poucas horas ao local de lesão tecidual ou de entrada dos parasitas. Este recrutamento rápido de neutrófilos foi demonstrado pela primeira vez com o inóculo artificial de grande quantidade de parasitas na pele (TACCHINI-COTTIER *et al.*, 2000). Estes achados foram depois confirmados com infecção natural com *L. major* e a utilização de microscopia intravital (PETERS *et al.*, 2008). Em modelos experimentais, as linhagens de camundongos resistentes à *L. major* apresentam uma diminuição no percentual de neutrófilos no terceiro dia após a infecção. Por outro lado, em animais susceptíveis, os neutrófilos continuam sendo recrutados e detectados em grande número até 10 dias depois da infecção (CHEN *et al.*, 2005).

Apesar dos mecanismos microbicidas dos neutrófilos, alguns patógenos, incluindo a *Leishmania*, podem se manter, de modo transiente, no interior destas células. Mecanismos de evasão tais como inibição da explosão respiratória (LAUFS *et al.*, 2002) e a capacidade de se manter em compartimentos não-líticos dos neutrófilos são exemplos de tais mecanismos (GUEIRARD *et al.*, 2008). Também já foi demonstrado que a infecção de neutrófilos humanos por *L. major* aumenta o tempo de vida dessas células por inibir a ação das caspases (AGA *et al.*, 2002).

Outro aspecto importante da biologia dos neutrófilos é sua interação com outros leucócitos no local da infecção e suas conseqüências no desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Já foi demonstrado que a interação entre macrófagos e neutrófilos apoptóticos de camundongos susceptíveis favorece o crescimento de *L. major* através da produção de PGE2 e TGF- β por macrófagos. Em animais resistentes, esta interação induz a eliminação do parasita pelo TNF produzido por macrófagos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004). Estes achados indicam que os neutrófilos são hospedeiros transientes de *L. major* nos momentos iniciais da infecção. Quando os macrófagos se tornam o principal tipo celular no infiltrado inflamatório (BEIL *et al.*, 1992; LAUFS *et al.*, 2002; PETERS *et al.*, 2008; TACCHINI-COTTIER *et al.*, 2000), os parasitos são transferidos para os macrófagos, onde a *Leishmania* prolifera. O mecanismo exato pelo qual os parasitos dos neutrófilos são transferidos para os macrófagos ainda não está esclarecido. No entanto, a hipótese do “cavalo de Tróia”, baseada em dados de co-cultura *in vitro*, sugere que macrófagos podem fagocitar neutrófilos apoptóticos infectados (LASKAY *et al.*, 2008; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Resultados similares foram obtidos pelo nosso grupo com *L. braziliensis* (NOVAIS *et al.*, 2009) e também com células humanas e *L. amazonensis* (AFONSO *et al.*, 2008). Além da interação com macrófagos, a infecção por *L. major* induz produção de CCL3 pelos neutrófilos, responsável pelo recrutamento de células dendríticas para o local da infecção (CHARMOY *et al.*, 2010). Recentemente foi demonstrado que, de fato, células dendríticas podem fagocitar neutrófilos infectados com *L. major* e esta interação inibe o desenvolvimento da resposta imune

adquirida (RIBEIRO-GOMES et al., 2012). Em modelo experimental com a bactéria *Citrobacter rodentium*, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados por células apresentadoras de antígeno induziu imunidade adaptativa mediada por linfócitos Th17 (TORCHINSKY et al., 2009).

Estes achados revelam a importância dos neutrófilos nos primeiros momentos da infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, mas também no potencial que estas células têm em definir ou influenciar o direcionamento da resposta imune adaptativa protetora.

3.5 Fagocitose: um processo mediado por receptores

A fagocitose é um evento mediado por receptores e, diante da ampla variedade de partículas que podem ser fagocitadas, inúmeros tipos de receptores podem mediar esse processo. Bactérias, fungos e parasitos possuem muitas moléculas que não estão presentes em organismos superiores. Estes padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) podem ser detectados por diversos receptores, em especial os receptores do tipo *Toll* (TLR), mas também por receptores fagocíticos, como o receptor de manose (CD206) (EZEKOWITZ et al., 1990), Dectina-1 (HERRE et al., 2004) ou CD14 (SCHIFF et al., 1997). Alguns desses receptores são suficientes para induzir a fagocitose, mas a expressão heteróloga de diferentes receptores pode aumentar a capacidade fagocítica (EZEKOWITZ et al., 1990; HERRE et al., 2004). A contribuição dos receptores de PAMPs pode ainda ser controversa em induzir a fagocitose mediada por outros receptores (DOYLE et al., 2004).

Além da afinidade do receptor ao seu ligante, sua dinâmica na superfície da célula também pode influenciar a resposta fagocítica (JAUMOUILLÉ & GRINSTEIN, 2011). Receptores fagocíticos geralmente são ativados quando formam multímeros,

como resultado da coalescência na membrana. Diversos receptores atuam em conjunto para contrapor a tendência da partícula em se desligar por movimento Browniano ou motilidade do patógeno. Essa atuação em conjunto de receptores é facilitada pela natureza dinâmica dos fagócitos, que estendem projeções membranosas dependentes de actina de modo contínuo para varrer o microambiente próximo (FLANNAGAN *et al.*, 2010; KRESS *et al.*, 2007; PATEL & HARRISON, 2008).

Já foi demonstrado para *L. infantum chagasi* que microdomínios ricos em colesterol e caveolina, que possuíam agrupamentos do receptor do complemento 3 (CR3), seriam a via de entrada do parasito em macrófagos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2006). O CR3, em conjunto com o receptor de manose, também pode participar na interação entre *L. donovani* e macrófagos murinos e humanos (WILSON & PEARSON, 1988). Além disso, a internalização de microorganismos é freqüentemente acompanhada de respostas inflamatórias induzidas por TLR, sugerindo que fagocitose e ativação de TLR podem ser funcionalmente interligadas (UNDERHILL & GANTNER, 2004). No entanto, células não-fagocíticas expressam TLRs e respondem aos seus ligantes, mas não internalizam microorganismos. Ademais, a expressão experimental de receptores fagocíticos em células não-fagocíticas é suficiente para reconstituir a fagocitose. Por outro lado, a expressão de TLRs não confere capacidade a estas células de internalizar partículas com estímulos para TLR (UNDERHILL & GANTNER, 2004). Também a deleção de TLR2 ou MyD88 não tem efeito na internalização de zymosan, estímulo do TLR2 (GANTNER *et al.*, 2003).

Os TLRs e seus ligantes são funcionalmente diferentes dos receptores fagocíticos e seus ligantes. Ligantes dos TLRs podem ser reconhecidos como moléculas solúveis, enquanto os alvos dos receptores fagocíticos devem estar ligados à superfície do microorganismo (UNDERHILL & GANTNER, 2004). No entanto, a sinalização via TLR pode interferir na eficiência da formação do fagossomo e aumentar a taxa de internalização. A sinalização via TLR ativa moléculas que também são necessárias para fagocitose, como PI3k (UNDERHILL &

OZINSKY, 2002) e PKC (SWEET & HUME, 1996). Também já foi demonstrado que a sinalização via TLR pode mediar a fosforilação de paxilina, uma proteína que se liga à actina encontrada nos fagossomos (HAZEKI *et al.*, 2003). Apesar dessa sobreposição entre as vias de sinalização do TLR e fagocitose, ainda não existem relatos diretos que a sinalização via TLR modula a eficiência da internalização.

A ativação da transcrição gênica em resposta ao TLR também está relacionada com produtos que participam da fagocitose. Cerca de 50 genes foram identificados cujos produtos participam em muitas etapas da fagocitose (HUME *et al.*, 2002). Estes achados sugerem que a resposta transcricional da ativação do TLR modula a fagocitose. Além disso, receptores envolvidos na fagocitose são diretamente regulados por TLRs. A estimulação de macrófagos por LPS aumenta a expressão do receptor fagocítico de bactéria MARCO (PEISER *et al.*, 2002). De fato, a expressão desse receptor parece ser dependente da sinalização via TLR, uma vez que macrófagos deficientes em MyD88 apresentam redução significativa de MARCO (SHI *et al.*, 2003). O receptor Fc também pode ser modulado por TLR, uma vez que citocinas produzidas em resposta ao LPS favorecem sua expressão (RAVETCH & BOLLAND, 2001). Diante desses relatos, se faz necessário investigar o papel dos TLRs na modulação da fagocitose para distinguir a regulação direta da maquinaria fagocítica e a contribuição na resposta transcricional.

3.6 Neutrófilos e mediadores lipídicos

Mediadores solúveis têm papel crucial na indução e resolução da inflamação. Em neutrófilos, estudos recentes apontam o papel proeminente de mediadores lipídicos. Nos momentos iniciais da inflamação, os neutrófilos produzem mediadores lipídicos pró-inflamatórios, como leucotrienos e prostaglandinas. A síntese de leucotrienos a partir do seu substrato, ácido araquidônico, é iniciado pela 5-lipoxigenase (5-LO) em conjunto com a FLAP (proteína ativadora da 5-LO) (PETERS-GOLDEN & BROCK, 2003), gerando leucotrieno A₄ (LTA₄). Este último é

convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄) pela LTA₄-hidrolase ou em leucotrieno C₄ (LTC₄) pela LTC₄-sintase e são exportados da célula por proteínas transportadoras específicas. Os neutrófilos, porém, não dispõem da LTC₄-sintase, sendo capazes de produzir apenas LTB₄ (PETERS-GOLDEN & HENDERSON, 2007).

O modo de ação do LTB₄ se dá através da ligação com receptores específicos expressos na superfície dos leucócitos. O receptor 1 de leucotrieno B (BLT1) é o receptor de alta afinidade para LTB₄ e é responsável pelos seus efeitos quimiotático e pró-inflamatório (TAGER & LUSTER, 2003). O receptor 2 de leucotrieno B (BLT2) tem baixa afinidade pelo LTB₄ e também se liga a outros produtos da 5-LO, mas pouco se sabe sobre sua função fisiológica. Após a ligação com LTB₄, estes receptores interagem com a proteína G no citoplasma, induzindo aumento nos níveis de cálcio e redução de AMP cíclico intracelular. Tais sinais ativam cascatas de cinases que alteram a biologia e função dos neutrófilos, como migração (MEDEIROS, A I *et al.*, 1999), aumento da capacidade fagocítica (MANCUSO *et al.*, 1998) e eliminação de microorganismos através da degranulação (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2005; SEREZANI, CARLOS H C *et al.*, 2005). Recentemente, o PPAR α foi identificado como receptor endógeno do LTB₄ (NARALA *et al.*, 2010).

Embora mais comumente conhecidos por sua participação em doenças inflamatórias, como asma (LUSTER & TAGER, 2004) e aterosclerose (LÖTZER *et al.*, 2005), muitos estudos com modelos *in vivo* e *in vitro* têm ressaltado a importância dos leucotrienos em respostas protetoras contra infecções. Tais estudos apontam o papel fundamental dos leucotrienos nas capacidades fagocíticas e de eliminação de muitos tipos de microorganismos. Este papel protetor dos leucotrienos endógenos já é descrito para modelos de peritonite bacteriana (MALAVIYA & ABRAHAM, 2000). Neste estudo, os autores mostram produção de LTB₄ e LTC₄ *in vitro* por mastócitos de medula óssea de camundongos estimulados com *Escherichia coli*. Em animais tratados com inibidor da 5-LO ou deficientes em mastócitos, o controle da infecção foi significativamente reduzido. Estes achados estavam relacionados com o menor

influxo de neutrófilos, avaliado pela atividade de MPO, para o local da infecções animais (MALAVIYA & ABRAHAM, 2000).

Também em modelos murinos de tuberculose, a inibição da 5-LO reduziu os níveis pulmonares de LTB₄, aumentou a mortalidade e bacteremia (PERES *et al.*, 2007). Embora estes animais não apresentassem redução no recrutamento de leucócitos para o pulmão, eles produziam menos óxido nítrico (NO), IL-12 e IFN- γ , indicando a regulação positiva da resposta protetora Th1 por leucotrienos (PERES *et al.*, 2007).

Os produtos da 5-LO também foram implicados no controle da infecção pulmonar experimental pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Esta infecção causou aumento significativo da letalidade em animais deficientes para a 5-LO, associado com maior bacteremia. No entanto, o recrutamento de neutrófilos para o pulmão não foi alterado. Por outro lado, os macrófagos alveolares dos camundongos deficientes em 5-LO tinham capacidade fagocítica e de destruição de bactérias reduzidas. Estes efeitos foram revertidos através da adição de LTB₄ exógeno (BAILIE *et al.*, 1996).

Dados similares foram obtidos com a infecção pulmonar de camundongos pelo fungo *Histoplasma capsulatum*. A inibição *in vivo* da síntese de leucotrienos durante a infecção aumentou a mortalidade dos animais, mas também aumentou a resposta inflamatória, com maior recrutamento de leucócitos para o pulmão (MEDEIROS *et al.*, 2004). Esta inflamação mais intensa provavelmente foi devido ao aumento nos níveis de TNF- α , IL-1 e IL-6. Por outro lado, a redução de óxido nítrico (NO), IL-2, IL-5, IL-12 e IFN- γ levou ao aumento da disponibilidade do fungo nos pulmões e também no baço (MEDEIROS *et al.*, 2004). Além disso, os leucotrienos também estão envolvidos na resposta imune secundária à imunização em modelo experimental de infecção por *H. capsulatum*. Os resultados deste estudos mostram que a proteção de animais imunizados com antígenos de *H. capsulatum* estava associada com aumento na produção de LTB₄, IFN- γ e recrutamento de células T de

memória para os pulmões (MEDEIROS et al., 2008). Por outro lado, animais deficientes em 5-LO apresentaram redução significativa no recrutamento de células T de memória associada com aumento da mortalidade (MEDEIROS et al., 2008; SECATTO *et al.*, 2012).

O envolvimento dos leucotrienos no controle de infecções por protozoários também é conhecido. Em modelos experimentais, tanto LTB₄ quanto LTC₄ aumentam fagocitose e eliminação de *Trypanosoma cruzi* por macrófagos peritoneais (WIRTH & KIERSZENBAUM, 1985). O provável mecanismo responsável por esse controle é a indução de NO por LTB₄, levando à destruição do parasita (TALVANI *et al.*, 2002). Além disso, a eliminação de *Toxoplasma gondii* por monócitos humanos mediada por IFN- γ é dependente da produção de leucotrieno (YONG et al., 1994).

Considerando as espécies de *Leishmania*, já foi relatado na literatura, ativação da 5-LO com metabolismo do ácido araquidônico durante infecções *in vivo* e *in vitro* por *L. donovani* (REINER & MALEMUD, 1984, 1985). No entanto, pouco se sabe se os leucotrienos participam na resposta do hospedeiro contra a infecção por *Leishmania* em neutrófilos. Milano e colaboradores, em 1996, avaliaram o envolvimento do LTB₄ na evolução da infecção por *L. major* em camundongos. Eles observaram níveis elevados de LTB₄ nas culturas *ex vivo* de esplenócitos nos momentos iniciais da infecção, o que seria um sinal de inflamação mais intensa e estímulo para o recrutamento de células inflamatórias. Além disso, LTB₄ exógeno induziu aumento na produção *in vitro* de citocinas tanto do perfil Th1 quanto Th2, sugerindo que o LTB₄ age no recrutamento de células já comprometidas com o perfil Th1 ou Th2 (MILANO *et al.*, 1996).

Mais recentemente, foi demonstrado que leucotrienos, tanto endógeno quando exógeno, aumentam a atividade leishmanicida de macrófagos murinos *in vitro* (SEREZANI et al., 2006). Além disso, este estudo identificou que o controle da infecção por *L. amazonensis* induzido por leucotrienos é dependente da produção de

NO e que o LTB4 é o principal produto da 5-LO envolvido nesse fenômeno (SEREZANI et al., 2006). Estes achados apontam a importância do LTB4 como mediador essencial no controle da infecção por *Leishmania*.

Os dados descritos na literatura sugerem o papel relevante do LTB4 no controle de microorganismos infecciosos, porém estes estudos foram conduzidos principalmente com macrófagos obtidos a partir de camundongos. Apesar disso, a principal célula produtora de LTB4 é o neutrófilo (PETERS-GOLDEN & HENDERSON, 2007) e poucos estudos abordam seu papel em respostas protetoras em doenças infecciosas, em especial as leishmanioses. Diante disso, no presente estudo, iniciamos uma investigação sobre a interação entre neutrófilos humanos e *L. amazonensis*, com ênfase no papel do LTB4 no controle da infecção.

4. JUSTIFICATIVA

Estudos recentes têm revelado o papel fundamental dos leucotrienos, em especial do LTB₄, no controle de infecções por microorganismos. No entanto, pouco se sabe sobre sua importância no controle da leishmaniose, principalmente em humanos. Além disso, a maioria destes estudos aborda o macrófago como o tipo celular principal na produção do LTB₄. Portanto, os achados decorrentes do presente trabalho tentam esclarecer os mecanismos envolvidos na interação entre *Leishmania amazonensis* e neutrófilos humanos, com ênfase no papel do LTB₄ no controle da infecção.

5. HIPÓTESE

O leucotrieno B₄ participa no controle da infecção por *Leishmania amazonensis* em neutrófilos humanos.

6. OBJETIVO GERAL

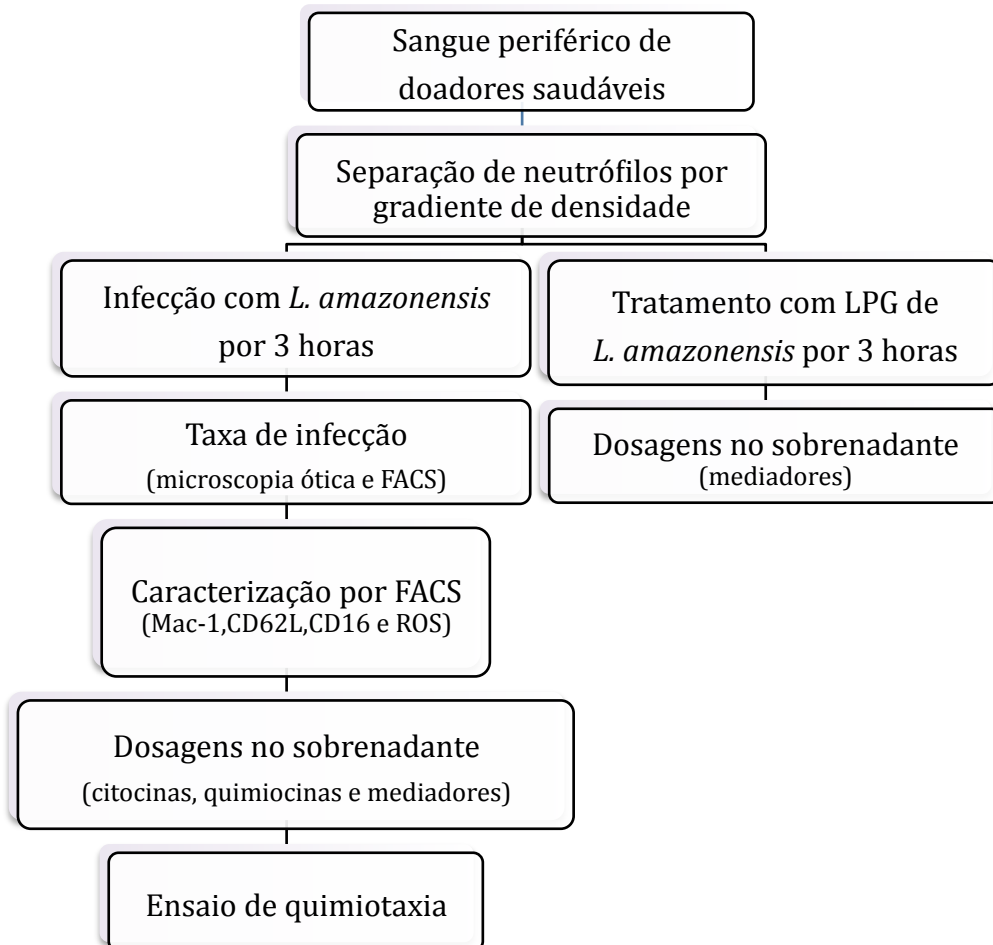
Investigar os mecanismos de interação entre *Leishmania amazonensis* e neutrófilos humanos com ênfase no papel do LTB₄.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

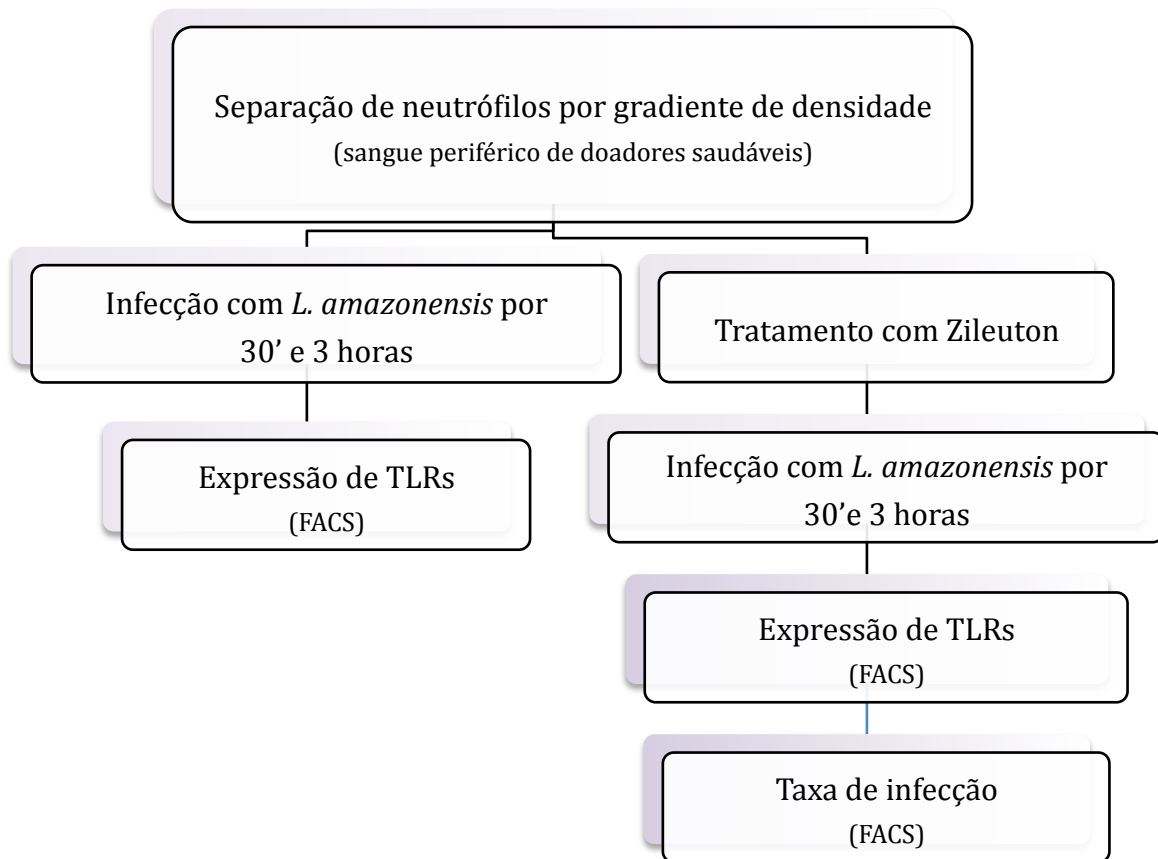
- Caracterizar o fenótipo, pela expressão de marcadores de superfície, e função, pela produção de quimiocinas, citocinas e mediadores, de neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis*;
- Avaliar o papel do leucotrieno B₄ produzido por neutrófilos humanos no controle da infecção por *L. amazonensis*;
- Investigar o papel dos receptores TLR na interação entre neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis*;
- Avaliar a importância das vias de sinalização intracelular no controle da infecção de neutrófilos humanos por *L. amazonensis*.

7. DESENHO EXPERIMENTAL

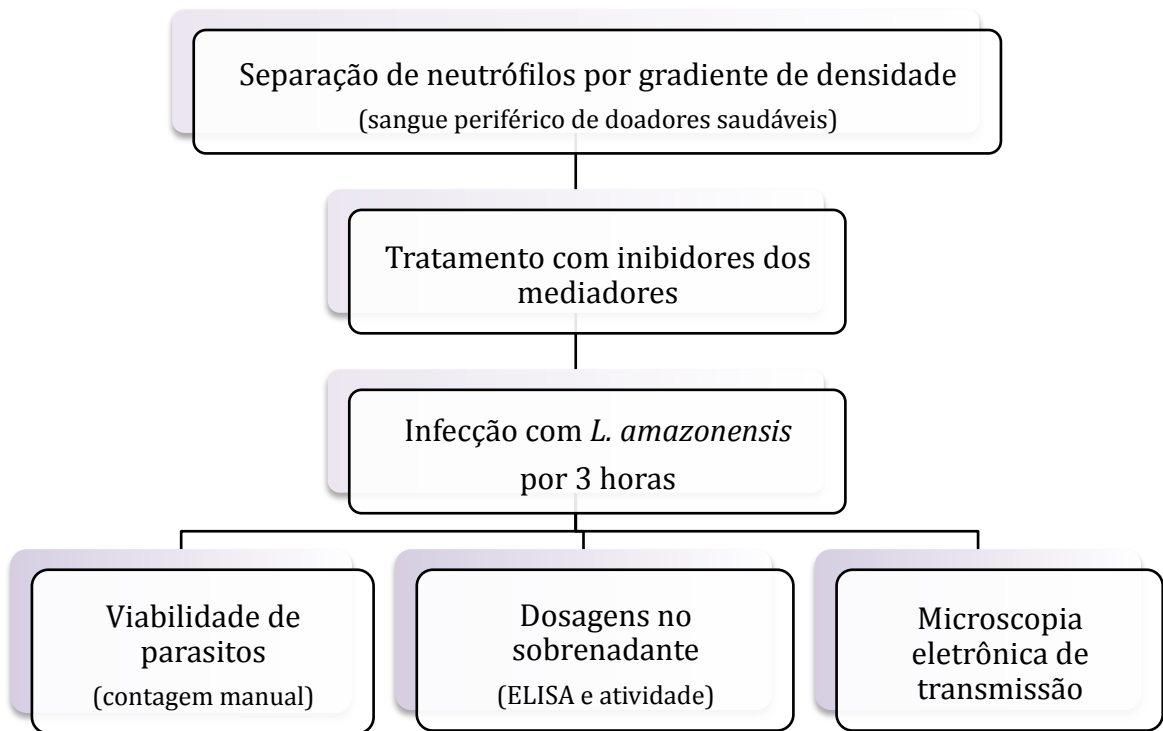
7.1 A infecção por *L. amazonensis* ativa neutrófilos humanos?



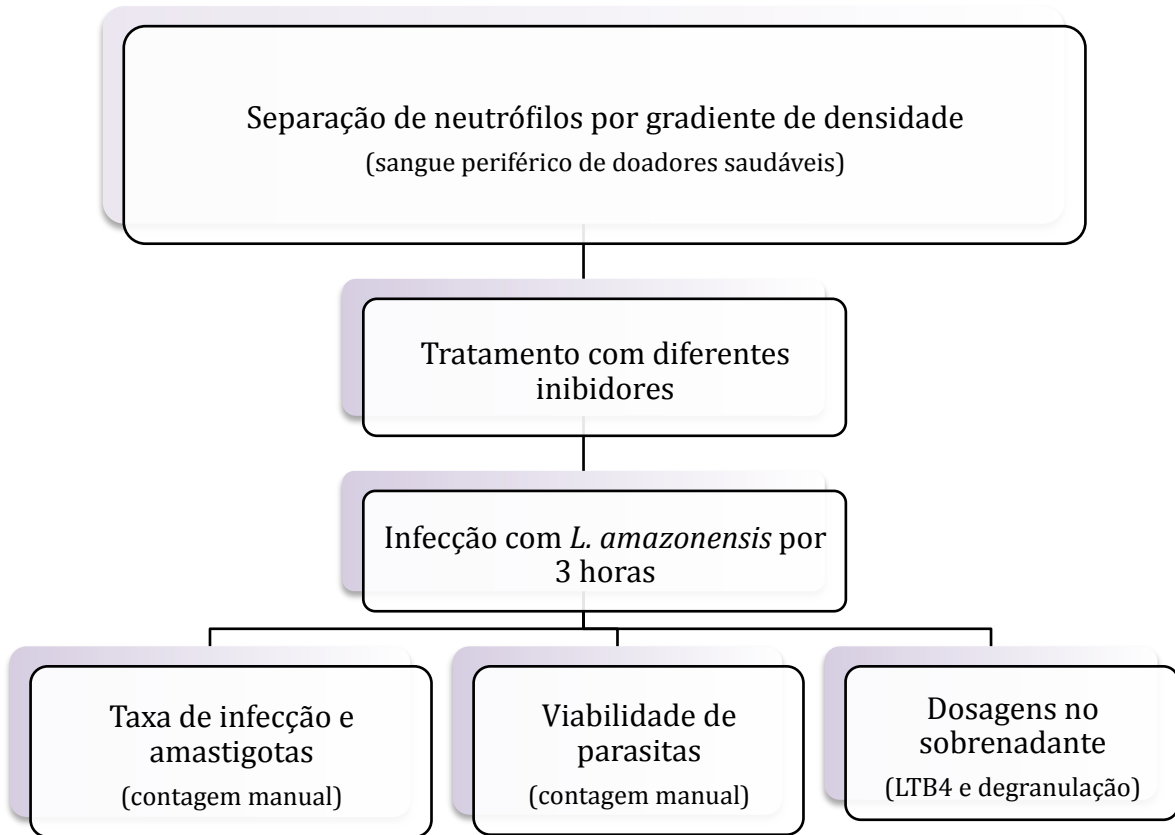
7.2 Qual o papel dos receptores TLRs na infecção de neutrófilos humanos por *L. amazonensis*?



7.3 Quais mediadores atuam no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos?



7.4 Quais vias de sinalização intracelular atuam no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos?



8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 Separação e cultura de células

As células foram separadas a partir do sangue periférico de doadores saudáveis do Hemocentro do Estado da Bahia. Para obtenção de neutrófilos, o sangue foi centrifugado em gradiente de separação (Polymorphprep) conforme instruções do fabricante (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Noruega) por 45 minutos a 300xg em temperatura ambiente. Após a centrifugação, duas regiões compostas por células são observadas. A região mais superficial é constituída por células mononucleares e a outra, por polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Assim, os neutrófilos foram coletados e centrifugados com salina por três vezes a 4°C durante 10 minutos a 200xg. Este método permite separar uma população purificada com cerca de 94% de neutrófilos. As células foram ressuspensas na concentração de $2,5 \times 10^5$ /mL em meio RPMI-1640 (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 1% de Nutridoma-SP (Roche, Indianápolis, IN, USA), 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100 μ /mL de estreptomicina (meio completo; todos da Gibco Invitrogen Corporation) para cultivo em placa de 96 poços (Corning Incorporation, Costar, NY, USA).

Os monócitos humanos também foram obtidos a partir da centrifugação do sangue em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) por 30 minutos a 300xg em temperatura ambiente. Em seguida, é observada uma região composta por células mononucleares que foi coletada e centrifugada com salina a 4°C em 200xg. Para diferenciação em células dendríticas, os monócitos foram cultivados por 7 dias na concentração de 5×10^5 /mL em meio completo na presença de IL-4 (100UI/mL) e GM-CSF (50ng/mL; ambos da PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) em placa de 24 poços. Nos dias 3 e 6 de cultura, meio fresco com tais citocinas foi adicionado.

8.2 Parasitas e infecção

Promastigotas de *Leishmania amazonensis*-GFP (MHOM/BR/87/BA125, uma linha transfectada de forma estável expressando a proteína fluorescente verde – GFP) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100µ/mL de estreptomicina (meio completo - todos da Gibco Invitrogen Corporation) a 27°C. Os parasitas em fase estacionária foram utilizados em ensaios de infecção de neutrófilos na proporção de 10:1 (parasitas por célula) em meio de cultura completo a 37°C com 5% de CO₂ por 3 horas. Após esse período, as células foram coletadas e centrifugadas com salina por duas vezes a 100xg e 80xg para remoção de parasitas não internalizados. Para observação e quantificação da infecção, as lâminas de citospin das células foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para microscopia ótica ou foram coradas em DAPI para microscopia confocal.

8.3 Caracterização fenotípica e funcional dos neutrófilos cultivados com *L. amazonensis*

A caracterização fenotípica dos neutrófilos foi avaliada pela expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo (FACSort, BD Biosciences, San Diego, CA, USA), utilizando anticorpos específicos conjugados à ficoetrina (todos da BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). O programa CellQuest (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) foi utilizado para a aquisição de cinquenta mil eventos por amostra e a análise dos resultados foi feita no programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA). A frequência de células expressando CD11b, CD18, CD62L e CD16, como também produzindo ROS (DHE, 10µM – Invitrogen/Molecular Probes, Grand Island, NY, USA), ou a media de intensidade de fluorescência para a expressão de TLR2 e TLR4

(ambos da Sigma-Aldrich) foram comparadas entre neutrófilos não-estimulados (Unst), não-infectados (GFP-) e infectados (GFP+).

Para a caracterização funcional dos neutrófilos, foram avaliadas a produção de quimiocinas, citocinas, mediadores lipídicos e liberação de enzimas presentes nos grânulos (degranulação) através da quantificação no sobrenadante. Após as três horas de cultura na presença ou não de *L. amazonensis* ou seu LPG (5µg/mL - gentilmente cedido pelo professor Dr. Rodrigo Soares), os sobrenadantes foram coletados e testados para a produção de IL-8, pelo *kit* CBA (BD Biosciences), CCL3, CCL4, CCL5 e CCL20 por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) de acordo com instruções do fabricante. TNF-α (BD Biosciences) e MMP-9 (R&D Systems) também foram avaliados por ELISA convencional. Os mediadores lipídicos LTB4 e PGE2 foram quantificados por ELISA de competição de acordo com instruções do fabricante (Cayman Chemical Company, MI, USA).

A atividade enzimática da elastase neutrofilica (NE) e mieloperoxidase (MPO) foram avaliadas nas mesmas condições experimentais, utilizando protocolos adaptados. Resumidamente, imediatamente após três horas de cultura com *L. amazonensis*, 50µL do sobrenadante fresco foi plaqueado em placas de 96 poços de ELISA. Em seguida, 25µL do tampão de reação, pH 7.5 (0.1M HEPES, 0.5M NaCl, 10% dimetilsulfoxido - todos da Sigma-Aldrich), acrescido de 150µL do substrato I da elastase (MeOSuc-AAPV-pna) a 0.2mM (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), foram adicionados e a placa foi incubada por 3 dias a 37°C. A atividade da elastase foi medida pela leitura em espectrofotômetro na absorvância de 410nm, utilizando curva padrão com diluições seriadas da elastase humana purificada (US Biological, Massachusetts, USA), com primeiro ponto da curva correspondente a 1U/mL. Para a atividade da MPO, 25µL do sobrenadante fresco foi utilizado com 25µL do tampão de revelação (tampão citrato 0.1M, pH 5, OPD 0.5mg/mL e peróxido de hidrogênio 30%) por 20 minutos em temperatura ambiente protegido da luz. A reação foi

finalizada com 50µL de ácido sulfúrico 8N e a densidade ótica foi definida pela leitura em espectrofotômetro na absorbância de 492nm.

8.4 Inibição de mediadores e vias de sinalização intracelular

Para avaliar os mecanismos de modulação da resposta dos neutrófilos em presença de *L. amazonensis*, as células foram tratadas com inibidores antes da infecção. Dentre os tratamentos, o Zileuton (Cayman Chemical Company), inibidor da 5-LO, foi utilizado por 30 minutos a 10µM para inibir a produção de LTB₄. Outros inibidores foram empregados para intervir na ação de mediadores inflamatórios, como o TIMP (R&D Systems) para inibir MMP-9 a 30ng/mL, inibidor da mieloperoxidase (análogo do ácido benzóico hidrazida) a 1µg/mL e o anticorpo neutralizante da NE (ambos da Calbiochem) a 50µg/mL. O isotipo controle IgG (R&D Systems) ou DMSO (Sigma-Aldrich) também foram empregados como controles.

O agonista do TLR2, Pam3CysSK4 (200ng/mL) e os anticorpos neutralizantes anti-TLR2 e anti-TLR4 (100µg/mL - todos da InvivoGen, San Diego, CA, USA) foram utilizados para avaliar o papel da sinalização de superfície na resposta dos neutrófilos. Também foram empregados inibidores farmacológicos para interferir em diferentes vias de sinalização intracelular. Para o NFκB foram utilizados BAY (10µg/mL - Merck-Calbiochem, Darmstadr, Hennen, Alemanha), que inibe a fosforilação do IκB, além do Wedelolactone (80µM - Sigma-Aldrich) que inibe a atividade do IKK. O LY294002 (10µM) foi utilizado para inibir a via do PI3k (Cayman Chemical Company), o PD98059 (50µM) para inibição do MEK e Bisindolylmaleimide (BIS - 20nM) para inibir a PKC (ambos da Cayman Chemical Company).

Os receptores de LTB₄ também foram farmacologicamente inibidos. Para o BLT₁, foi utilizado seu antagonista U-75302 (5μM) e para o PPAR_α, MK886 (10μM – ambos da Cayman Chemical Company).

8.5 Viabilidade de parasitas

Apos as 3 horas de infecção, a placa de cultura foi centrifugada por 2 vezes com salina (100xg e 80xg a 4°C) para remoção dos parasitas não internalizados pelos neutrófilos. Depois da última centrifugação, as células foram ressuspensas em meio Schneider completo e cultivadas por 24 horas a 22°C. Em seguida, foi realizada a contagem manual de parasitas viáveis.

8.6 Extração e purificação do lipofosfoglicano (LPG)

O LPG de *L. amazonensis* foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Ulisses Gazos Lopes e obtido a partir de culturas de promastigotas nos momentos iniciais da fase estacionária. De modo breve, o LPG foi extraído em solvente E (H₂O / etanol / éter dietil / piridina / NH₄OH em proporção 15: 15: 5: 1: 0.017). O extrato foi desidratado por evaporação N₂, resuspenso em 0.1N de ácido acético e 0.1M de cloreto de sódio e aplicado em coluna de fenil-sefarose (2mL), equilibrado com o mesmo tampão. O LPG foi eluído utilizando solvente E (COELHO-FINAMORE *et al.*, 2011).

8.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Apos as 3 horas de cultura dos neutrófilos em presença de *L. amazonensis*, as células foram coletadas e fixadas em tampão cacodilato 0.1M, pH 7.2, com 1% de glutaraldeído (Sigma-Aldrich), 4% de formaldeído e 5mM de CaCl₂. Em seguida, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% e 0.08% de ferricianeto de potássio. A desidratação foi feita em séries crescentes de concentração de acetona e substituída por resina Polybed (Polysciences Inc., USA). Depois do cortadas em secções ultrafinas, as células foram coradas com acetato de uranila e citrato para observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 e registro de imagens representativas.

8.8 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad 5.0 (San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos em mediana, como analisado pelo teste t Mann-Whitney ou ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

9. RESULTADOS

9.1 Comparação da eficiência entre microscopia ótica e citometria de fluxo para análise da taxa de infecção por *Leishmania amazonensis* em neutrófilos humanos.

Considerando a utilização de *Leishmania amazonensis*-GFP para os ensaios de infecção, avaliamos a eficiência da citometria de fluxo como técnica para estimar a taxa de infecção. A metodologia mais comumente empregada para este tipo de estimativa é a microscopia ótica, onde a quantificação de parasitas é feita manualmente. Por isso, os diferentes métodos de análise da taxa de infecção foram comparados. Os resultados obtidos mostram que não há diferença significativa entre os métodos (figura 1 A). A média de infecção obtida por microscopia ótica (figura 1 B) é de 40% (figura 1 A), enquanto a média por citometria de fluxo (figura 1 C) é de 50% (figura 1 A). Essa diferença, apesar de não ter relevância estatística, provavelmente é devida à presença de parasitas aderidos à superfície dos neutrófilos.

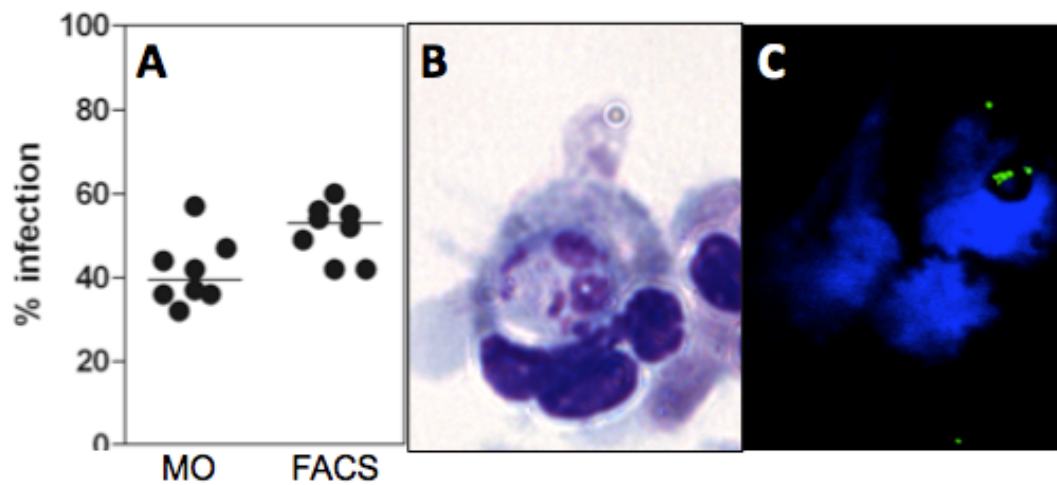


Figura 1. Análise entre microscopia ótica (MO) e citometria de fluxo (FACS) para determinar taxa de infecção de neutrófilos humanos com *Leishmania amazonensis*-GFP. Neutrófilos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis e infectados com *Leishmania amazonensis*-GFP (1 neutrófilo/10 parasitas) por 3 horas. A taxa de infecção foi avaliada por microscopia ótica e citometria de fluxo (A). As imagens são representativas de cada método: microscopia ótica (B) e confocal (C).

9.2 Avaliação da expressão de marcadores de superfície e produção de ROS por neutrófilos humanos infectados com *Leishmania amazonensis*-GFP.

A frequência da expressão de marcadores de superfície foi comparada entre neutrófilos não estimulados (Meio), infectados (GFP+) e não-infectados (GFP-), que foram definidos pela expressão de GFP (figura 2 A). A expressão dos componentes do Mac-1, CD11b (figura 2 B) e CD18 (figura 1 C) encontra-se aumentada nos neutrófilos infectados. Como ilustrado pelos histogramas representativos, é possível observar o deslocamento para a direita da linha que representa a população GFP+ (cinza escuro) quando comparada com a condição Meio ou GFP- (figura 2 B e C). Avaliando todos os doadores, foi observado que, em média, 88% dos neutrófilos não estimulados (Meio) são CD11b+ e CD18+, comparados aos 94% (figura 2 G) e 95% (figura 2 H) dos neutrófilos GFP+, respectivamente.

Por outro lado, a infecção por *L. amazonensis* induziu redução na expressão de CD62L (figura 2 D) e CD16 (figura 2 E) nos neutrófilos GFP+ em comparação aos não estimulados. Considerando-se estes últimos marcadores, não foram observadas diferenças entre neutrófilos GFP+ e GFP- (figura 2 I e J), indicando que células GFP- podem apresentar algum grau de ativação, provavelmente pela liberação de moléculas do parasita (CARVALHO et al., 2008).

Por fim, as células foram avaliadas para a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS). Um aumento na produção de ROS é observado nas células GFP+ (figura 2 F). A média de células produtoras de ROS na população GFP+ é de 80% (figura 2 K), um aumento significativo comparado aos 38% nas células não estimuladas ou GFP- (figura 2 K).

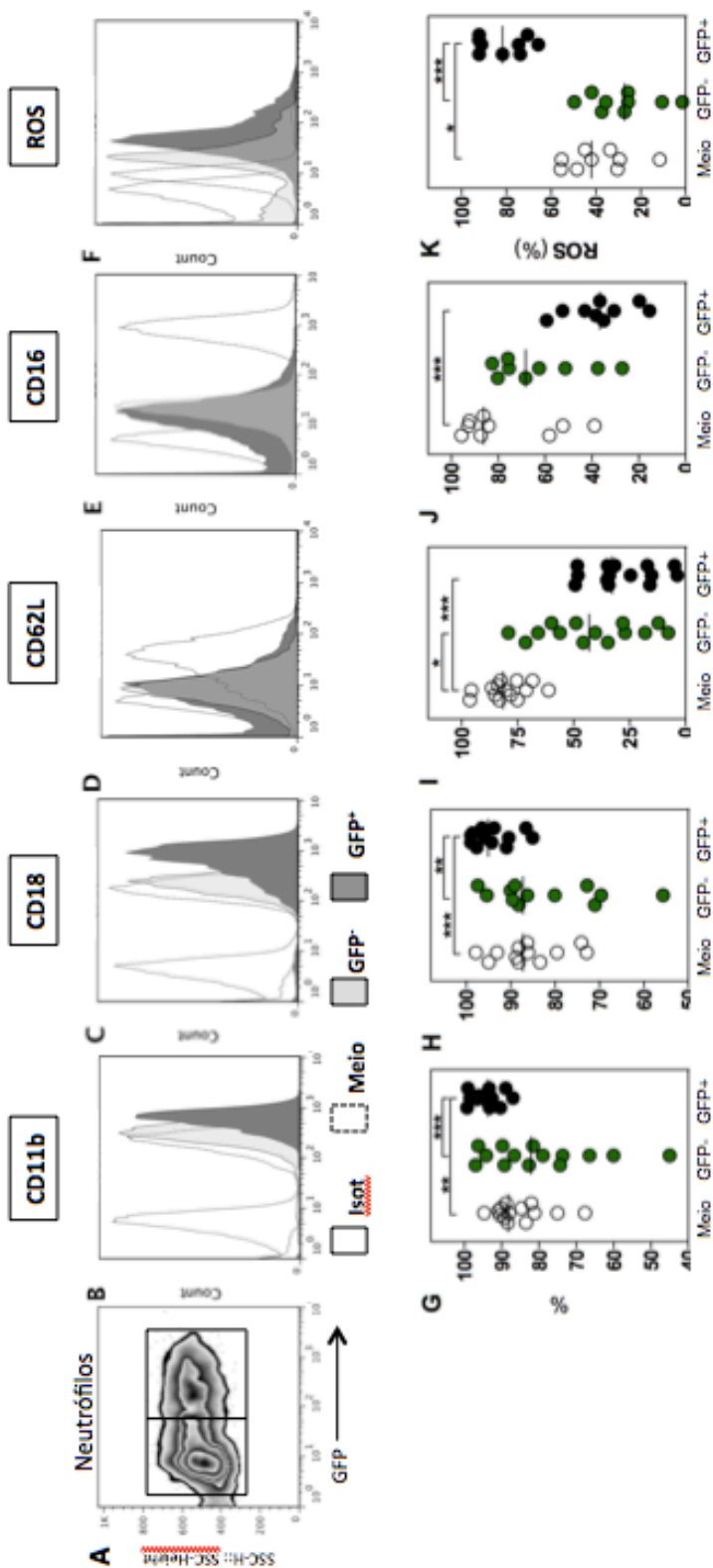


Figura 2. Infecção por *L. amazonensis*-GFP induz expressão de marcadores de superfície e produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) em neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis. Os neutrófilos foram infectados com *L. amazonensis*-GFP (1 neutrófilo/10 parasitas) por 3 horas. A expressão dos marcadores de superfície, CD11b (B, G), CD18 (C, H), CD62L (D, I), CD16 (E, J) e a produção de ROS (F, K) foram avaliadas por citometria de fluxo entre neutrófilos não-estimulados (Meio), não-infectados (GFP-) e infectados (GFP+), considerando a expressão de GFP (A). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

9.3 Quantificação da produção de quimiocinas e capacidade de induzir migração de leucócitos em sobrenadante de cultura de neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis*.

Após 3 horas de cultura, os sobrenadantes (SBN) de neutrófilos não estimulados (Meio) ou infectados com *L. amazonensis* (L.a.) foram coletados e avaliados para a produção de quimiocinas por ELISA, bem como para a capacidade de induzir migração de diferentes leucócitos através de ensaio quimiotático.

A concentração de IL-8 é significativamente aumentada no SBN de neutrófilos infectados comparado ao SBN de neutrófilos não estimulados (figura 3 A). Resultados similares foram obtidos com relação à produção de CCL4 (figura 3 C) e CCL3 (figura 3 E) por neutrófilos infectados. Uma vez que estas citocinas estão relacionadas ao recrutamento de neutrófilos (figura 3 B), monócitos (figura 3 D) e células dendríticas (figura 3 F) respectivamente, os ensaios de quimiotaxia com os SBN de neutrófilos infectados mostrou aumento na migração destas células.

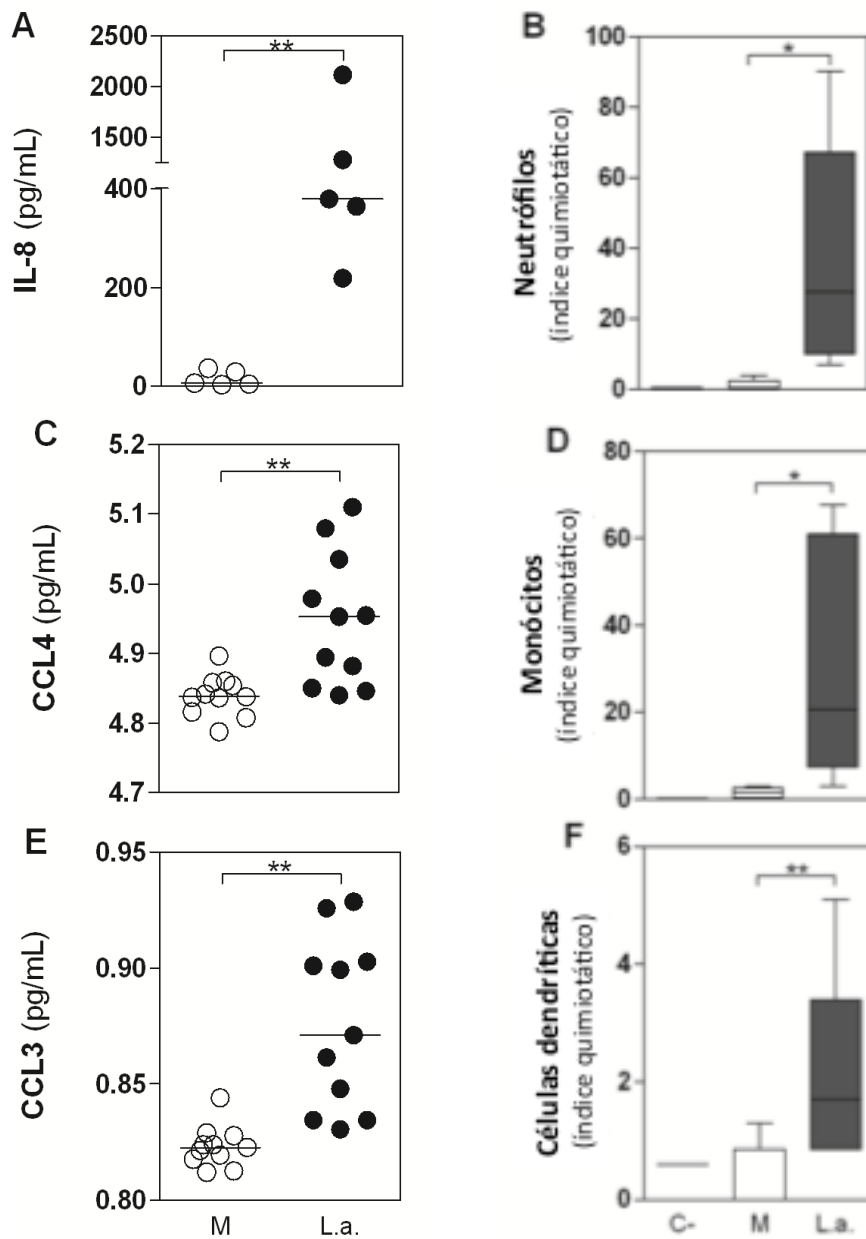


Figura 3. Infecção de neutrófilos humanos com *L. amazonensis* induz produção de quimiocinas e migração de diferentes leucócitos. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue total de doadores saudáveis. Os neutrófilos foram infectados com *L. amazonensis*-GFP (1 neutrófilo/10 parasitas) por 3 horas (L.a.) ou não (M). Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para quantificar a produção de quimiocinas como IL-8 (A), CCL4 (C) e CCL3 (E) por ELISA. Eles também foram utilizados para a avaliação da sua capacidade quimiotática em recrutar leucócitos como neutrófilos (B), monócitos (D) e células dendríticas (F) pelo ensaio quimiotático em placa de quimiotaxia. Após 1h30 as células que migraram em direção ao sobrenadante ou meio de cultura apenas (C-) foram contadas e o índice quimiotático foi calculado. Os valores representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes (n= 9). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste *t* não-paramétrico Mann-Whitney.

9.4 Avaliação da produção de mediadores lipídicos e degranulação de neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis*.

Apos 3 horas de cultura, os SBNs de neutrófilos não estimulados (Meio) ou infectados com *L. amazonensis* (L.a.) foram coletados e avaliados para a produção de mediadores lipídicos e degranulação por ELISA, além da atividade de enzimas neutrofílicas para substratos específicos.

A produção de leucotrieno B₄ (LTB₄) é significativamente aumentada no SBN de neutrófilos infectados quando comparada com não-estimulados (figura 4 A). A degranulação, avaliada pela quantidade de metaloproteinase 9 (MMP-9) liberada no SBN, é induzida pela infecção por *L. amazonensis* (figura 4 B). A atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e elastase neutrofílica (NE) também encontra-se significativamente aumentada nos SBNs dos neutrófilos infectados (figura 4 C e D respectivamente).

Os resultados obtidos com a análise fenotípica dos neutrófilos cultivados em presença de *L. amazonensis*, sugerem que células não-infectadas (GFP-) apresentam redução na expressão de CD62L (figura 2 I), caracterizando algum grau de ativação. O lipofosfoligiano (LPG), molécula presente na superfície de promastigotas de *Leishmania*, tem papel bem descrito na interação com células do hospedeiro (DE ASSIS *et al.*, 2012; VIVARINI *et al.*, 2011). Para testar a capacidade desta molécula em ativar leucócitos, neutrófilos humanos foram tratados por 3 horas com o LPG purificado de *L. amazonensis* e, em seguida, a produção de LTB₄ e degranulação foram avaliadas. A presença do LPG induziu aumento significativo na produção de LTB₄ (figura 4 E) e degranulação, mensurada pela elevação na concentração de MMP-9 (figura 4 F), além do aumento na atividade de MPO (figura 4 G). Estes achados indicam que o LPG, uma molécula majoritária da superfície do parasito, pode induzir diretamente a ativação em neutrófilos humanos com produção de mediadores lipídicos e degranulação.

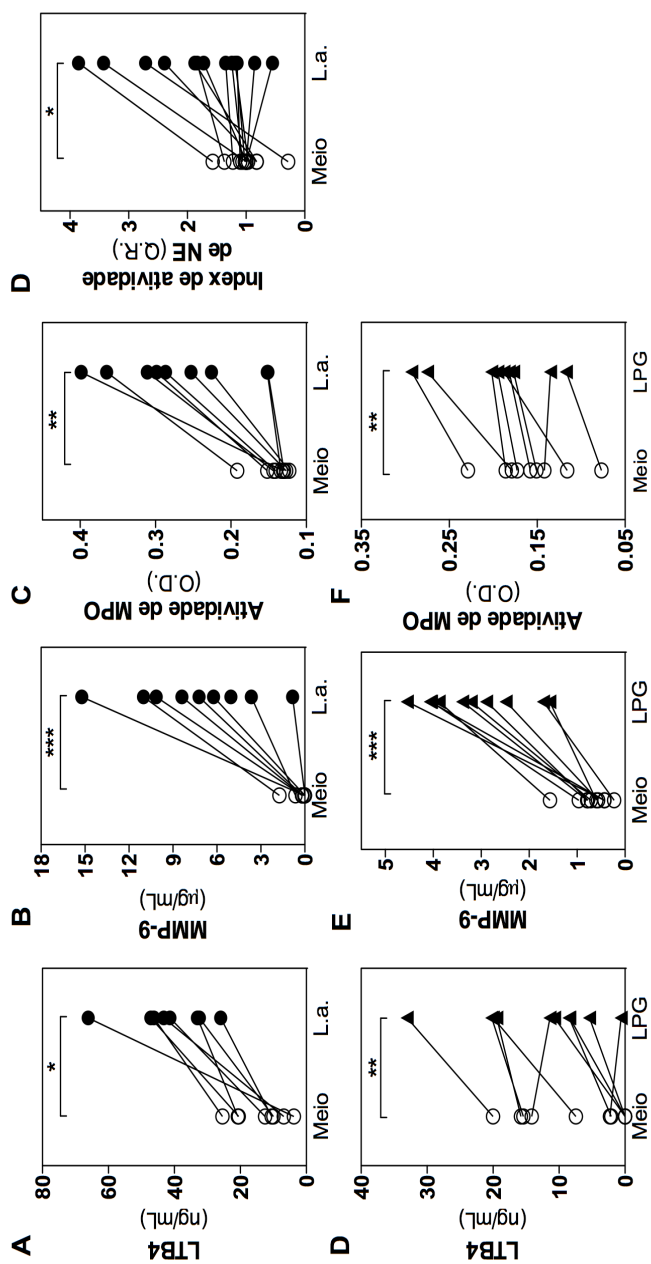


Figura 4. *Leishmania amazonensis* e seu LPG induzem produção de mediadores lipídicos e degranulação em neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis. As células foram infectadas com *L. amazonensis* (1 neutrófilo/10 parasitas) ou tratadas com LPG (5µg/mL) ou cultivadas sozinhas (Meio) por 3 horas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e utilizados para quantificar a produção de LTB4 por ELISA de competição (A, E), MMP-9 por ELISA sanduíche (B, F). MPO (C, G) e NE (D) foram avaliadas por sua atividade para substrato específico. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste *t* não-paramétrico Mann-Whitney.

9.5 Avaliação da expressão de TLR2 e TLR4 em neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis*-GFP.

Os TLRs detectam padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) derivados de vírus, bactérias, fungos e parasitas, incluindo lipoproteínas que são reconhecidas principalmente pelo TLR2 (AKIRA et al., 2000). Recentemente, o TLR2 foi descrito como receptor do LPG de *L. amazonensis* em macrófagos murinos (VIVARINI et al., 2011). Considerando a ativação observada em neutrófilos tratados com LPG (figura 4 E-G), a expressão do seu receptor, TLR2, foi avaliada durante a infecção por *L. amazonensis*-GFP.

A intensidade média de fluorescência (MFI) do TLR2 em neutrófilos humanos não-estimulados é cerca de 120 (figura 5 A). Após 30 minutos de contato com o parasita, o valor médio de MFI em neutrófilos infectados (GFP+) aumenta significativamente para cerca de 220 (figura 5 A). Esse valor é reduzido significativamente a níveis basais após 3 horas de infecção, atingindo valores semelhantes àqueles observados em neutrófilos não-estimulados (figura 5 A). Estes achados sugerem que a ativação de neutrófilos induzida por *L. amazonensis* acontece logo nos primeiros momentos de interação, levando ao aumento significativo na expressão de TLR2 após 30 minutos. A redução subsequente na sua expressão, após 3 horas, sugere que este receptor é internalizado durante a fagocitose do parasito.

Com o objetivo de investigar a participação de outros receptores na internalização da *Leishmania*, a expressão do TLR4 também foi analisada. A intensidade média de fluorescência deste receptor em neutrófilos humanos em repouso é cerca de 100 (figura 5 B). Após 30 minutos de cultura na presença de *L. amazonensis*-GFP, este valor aumenta significativamente para cerca de 200 (figura 5 B). No entanto, após 3 horas de infecção, este valor permanece praticamente inalterado (figura 5 B). Estes achados sugerem, então, que há um aumento

inespecífico na expressão de TLR4 nos momentos iniciais de ativação dos neutrófilos, porém, sem sua internalização. Estes dados apontam que o TLR4 não estaria envolvido no reconhecimento ou contato com *L. amazonensis*, nem seria endocitado com o parasito. Não foram observadas diferenças significativas na expressão desses receptores na população de neutrófilos GFP-.

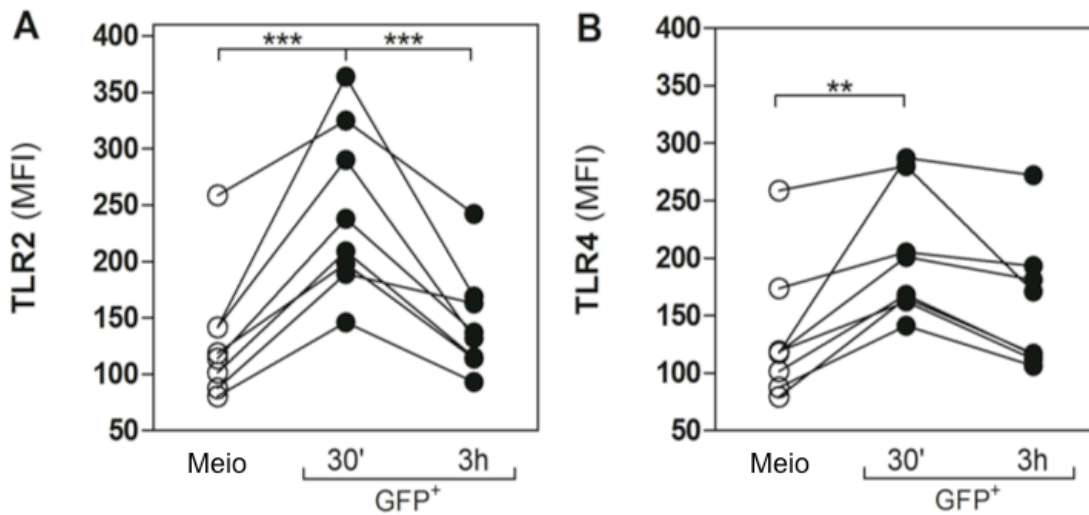


Figura 5. A fagocitose de *L. amazonensis*-GFP por neutrófilos humanos induz internalização de TLR2. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis. As células foram cultivadas na presença ou ausência de *L. amazonensis*-GFP por 30 minutos ou 3 horas. Nestes tempos, os neutrófilos foram coletados e avaliados por citometria de fluxo para a expressão de TLR2 (A) e TLR4 (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

Considerando o papel indutor do LTB₄ na fagocitose (OKAMOTO *et al.*, 2010; SECATTO *et al.*, 2012), a expressão do TLR2 e TLR4 foi avaliada em neutrófilos infectados com *L. amazonensis*-GFP previamente tratados com Zileuton, inibidor farmacológico da 5-LO.

Uma redução significativa foi observada na expressão do TLR2 em neutrófilos GFP+ tratados com Zileuton em comparação com aqueles não-tratados (figura 6 A). No entanto, nenhuma diferença na expressão do TLR4 foi observada (figura 6 B). Por fim, para confirmar o envolvimento desta via na fagocitose da *L. amazonensis*-GFP por neutrófilos humanos, a taxa de infecção foi analisada. De fato, uma redução significativa na capacidade fagocítica é observada em neutrófilos tratados com Zileuton (figura 6 C). Assim, estes dados indicam a importância do LTB₄ na expressão do TLR2, que é provavelmente endocitado pela fagocitose da *L. amazonensis*-GFP.

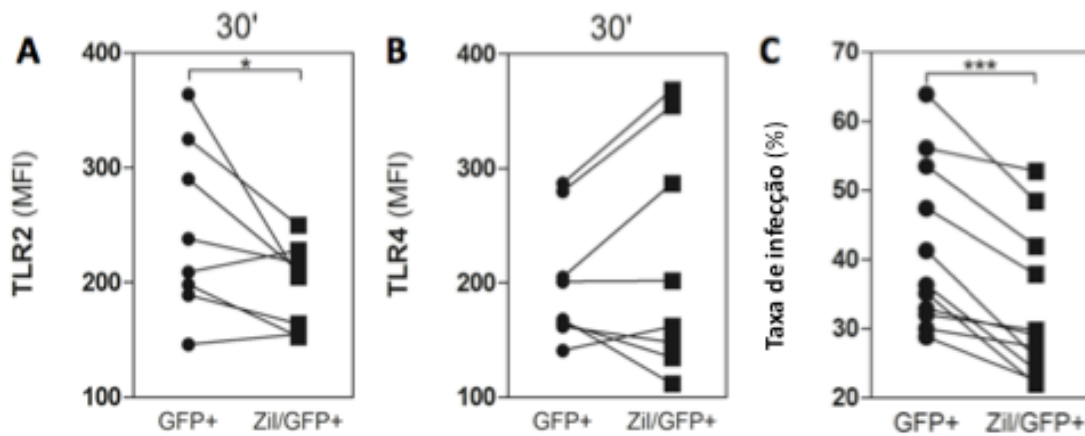


Figura 6. A expressão de TLR2 em neutrófilos humanos, na presença de *L. amazonensis*-GFP, é parcialmente dependente de LTB₄ e este aumenta a capacidade fagocítica. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue de doadores saudáveis. As células foram tratadas ou não com Zileuton e, em seguida, cultivadas com *L. amazonensis*-GFP. Após 30 minutos de cultura, os neutrófilos foram avaliados para a expressão de TLR2 (A) ou TLR4 (B). Para a avaliação da taxa de infecção (C), após 3 horas de cultura, o percentual de células GFP + foi avaliado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste *t* não-paramétrico Mann-Whitney.

9.6 Identificação de moléculas e enzimas neutrofilicas responsáveis pelo controle da infecção por *L. amazonensis*.

Com o objetivo de identificar os mediadores envolvidos no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos, inibidores farmacológicos foram utilizados para silenciar moléculas-alvo.

Os tratamentos com Zileuton, TIMP (inibidor da MMP-9) e anticorpo neutralizante para MPO (α MPO) induziram aumento significativo na viabilidade de parasitos (figura 7), sugerindo que na ausência dessas moléculas, o controle da infecção é comprometido. Não foram observadas, porém, diferenças na viabilidade de parasitas de neutrófilos tratados com o anticorpo neutralizante para NE (α NE), indicando que esta molécula não tem papel relevante no controle da infecção (figura 7).

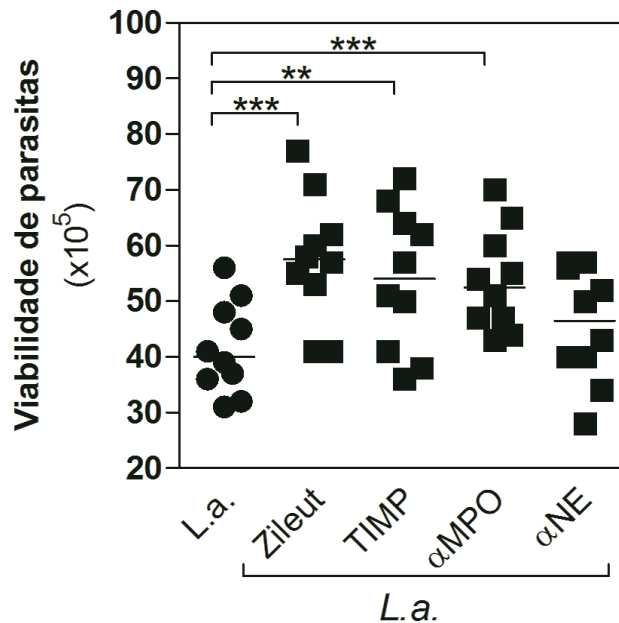


Figura 7. Inibição farmacológica de mediadores LTB₄, MMP-9 e MPO, reduzem a capacidade de neutrófilos humanos em controlar a infecção por *L. amazonensis*. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis. Após tratamento com Zileuton (inibidor da 5-LO, 10 μ M) ou TIMP (inibidor da MMP-9) ou anticorpos neutralizantes contra MPO (α MPO) ou NE (α NE), as células foram infectadas por 3 horas. Em seguida, o meio de cultura celular foi substituído por meio de cultura de parasitas e cultivado por 24 horas, quando foi feita a contagem dos parasitos viáveis. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 pelo teste t não-paramétrico Mann-Whitney.

9.7 Avaliação do papel do LTB₄ na degranulação e controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos.

O papel do LTB₄ na regulação da degranulação já é bem descrito na literatura (GAUDREULT & GOSSELIN, 2007; GAUDREULT *et al.*, 2005a). Assim, o papel desse mediador no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos foi avaliado.

Os resultados obtidos mostram que, de fato, a degranulação, avaliada pela liberação de MMP-9 (figura 8 A) e atividade de MPO (figura 8 B) nos sobrenadantes das culturas de neutrófilos infectados, foram significativamente reduzidas na ausência de LTB₄. Além disso, a produção de ROS também sofreu redução significativa com a inibição de LTB₄ (figura 8 C).

Estes achados foram confirmados por microscopia eletrônica de transmissão. A ultraestrutura das células não-infectadas mostra integridade e características típicas dos neutrófilos, como os grânulos citoplasmáticos (figura 8 D). Quando infectados por *L. amazonensis*, os neutrófilos apresentam vacúolos parasitóforos, contendo restos de parasitas internalizados ou parasitos intensamente vacuolizados com núcleo condensado, indicando sua destruição (figura 8 E). Por outro lado, quando os neutrófilos são tratados com zileuton e portanto, com ausência de LTB₄, antes de infecção, os parasitos internalizados aparecem íntegros, inclusive com flagelo (figura 8 F).

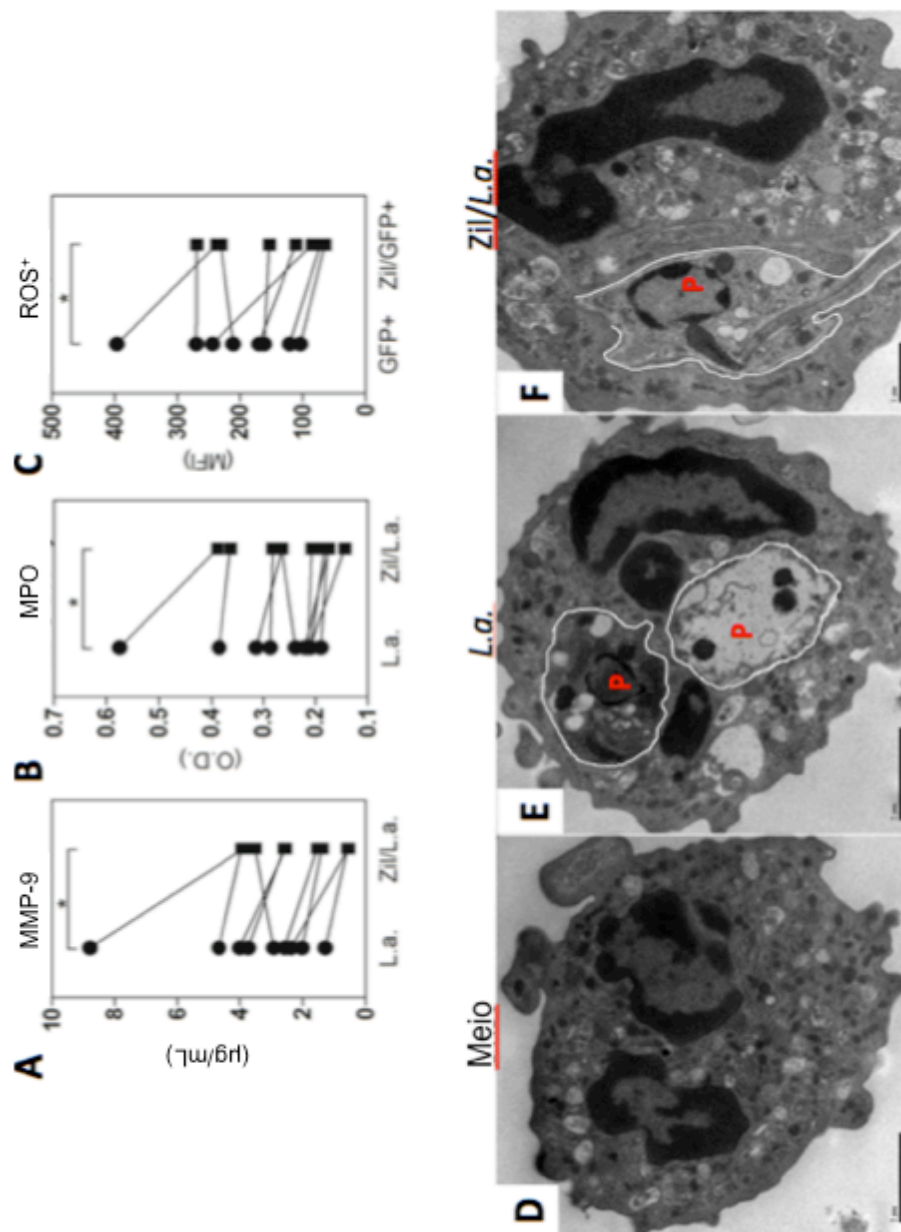


Figura 8. Os mecanismos de degranulação e controle da infecção por *L. amazonensis* são dependentes de LTB4 em neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis. Após tratamento ou não com zileuton, as células foram infectadas com *L. amazonensis* por 3 horas. O SBN das culturas foi coletado para dosagem de MMP-9 (A) e atividade de MPO (B). As células também foram coletadas para avaliação da produção de ROS por citometria de fluxo (C). Neutrófilos não-estimulados (Meio - D), infectados (*L.a.* - E) e infectados tratados com zileuton (Zil/*L.a.* - F) foram coletados e processados para microscopia eletrônica de transmissão para análise da ultraestrutura dos parasitas internalizados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste *t* não-paramétrico Mann-Whitney.

9.8 Avaliação das vias intracelulares de sinalização responsáveis pelo controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos.

Com o objetivo de investigar as vias de sinalização intracelular envolvidas no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos, foram utilizados inibidores farmacológicos, agonistas ou anticorpos neutralizantes contra diferentes moléculas de sinalização. Em seguida, foi avaliada a viabilidade de parasitas após esses tratamentos.

Esta abordagem experimental permitiu mostrar que a atividade leishmanicida é significativamente aumentada quando neutrófilos são tratados com Pam3CSK4 (Pam), o agonista do TLR2 (figura 9 A). Este resultado indica que a adição de outro ligante do TLR provavelmente aumenta os mecanismos envolvidos no controle da infecção. Por outro lado, quando o TLR2 foi neutralizado com anticorpo (α TLR2), não foi observada diferença na viabilidade de parasitas (figura 9 B). Além disso, o papel das vias de sinalização intracelular induzidas por TLR2, como o NFkB, no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos foi avaliado. O inibidor específico do NFkB, BAY, que inibe a fosforilação do Ikb, reduziu significativamente a atividade leishmanicida dos neutrófilos (figura 9 C). Resultados similares foram obtidos com Wedelolactone, um inibidor não-específico do NFkB (dados não mostrados).

Uma vez que nossa hipótese foi que o TLR2 seria a principal via de reconhecimento da *Leishmania* pelos neutrófilos, o seu bloqueio reduziria a internalização de parasitas. Para confirmar isso, o número de células infectadas e de parasitas fagocitados foram quantificados em neutrófilos tratados com anticorpo neutralizante contra TLR2 ou TLR4. Os achados confirmam a hipótese devido à redução da taxa de infecção (figura 9 D) e da internalização de parasitas (figura 9 E)

quando os neutrófilos foram tratados com anticorpo anti-TLR2, mas não com anti-TLR4.

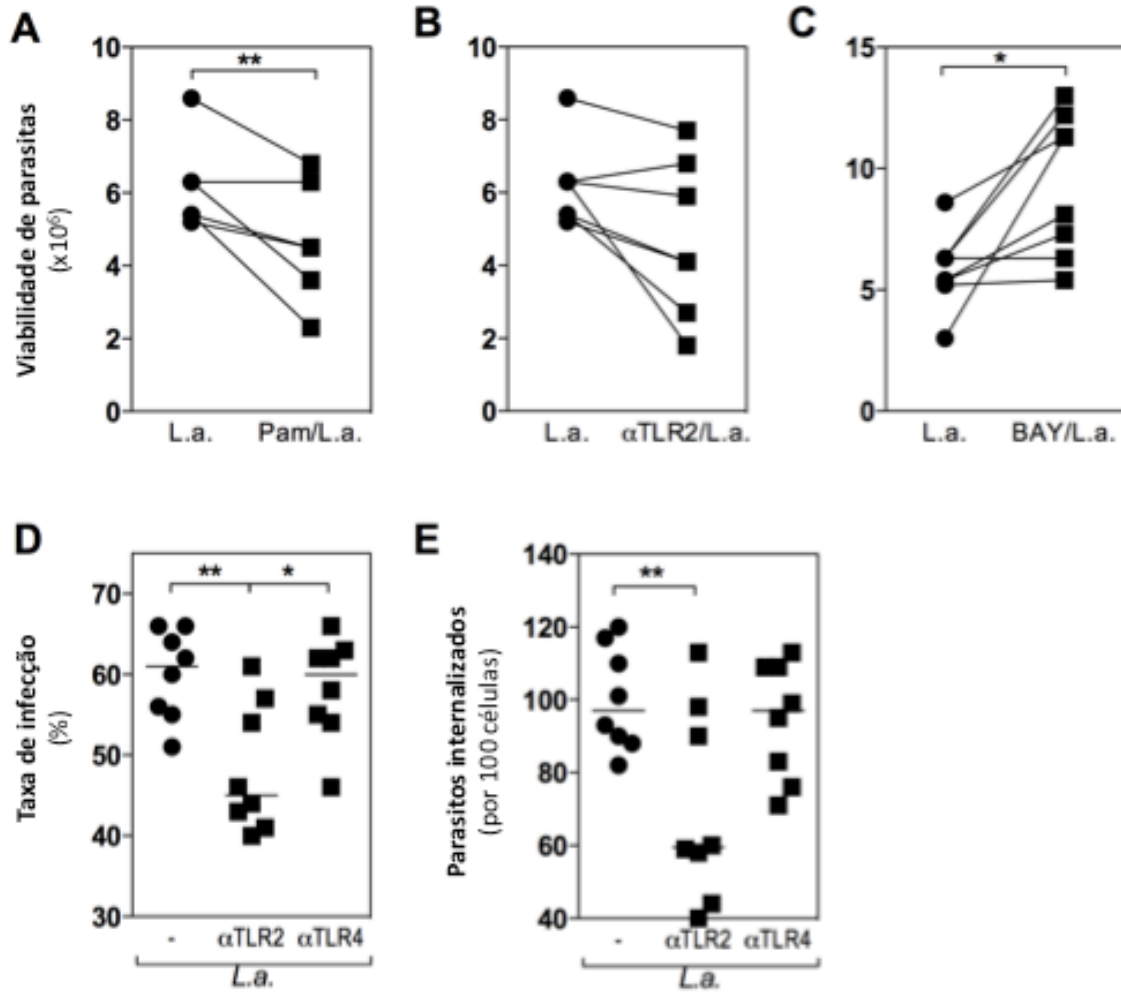


Figura 9. Atividade leishmanicida de neutrófilos humanos é mediada por TLR2 e sinalização via NFκB. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis. As células foram infectadas na presença do Pam3CSK4 (Pam), agonista do TLR2 (A) ou tratadas antes da infecção com anticorpo neutralizante contra TLR2 (α TLR2) ou TLR4 (α TLR4) ou BAY, inibidor específico do NFκB. Após a infecção por 3 horas, o meio de cultura celular foi substituído por meio de cultura de parasitas e cultivado por 24 horas, quando foi feita a contagem de parasitas viáveis ou Cytospin para determinação da carga parasitária ou número de parasitas fagocitados. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

Os mediadores envolvidos no controle da infecção, sinalizados por NFkB, foram identificados. De modo surpreendente, o tratamento com Pam em conjunto com a infecção não induziu diferenças na produção de LTB4 (figura 10 A), a degranulação, mensurada pela liberação de MMP-9 (figura 10 B), e a atividade de MPO (figura 10 C). Estes resultados foram provavelmente devido à intensa ativação dos neutrófilos induzida pela própria *L. amazonensis*. Nesse sentido, a adição de outro ligante de TLR2 não aumenta a produção de LTB4 e degranulação.

Resultados similares foram obtidos com o tratamento com o α TLR2. Considerando que o TLR2 pode ser um dos principais receptores envolvidos no reconhecimento de PAMPs de *L. amazonensis* (figuras 5 e 6), o seu bloqueio reduziu a taxa de infecção (figura 9 D) e a internalização de parasitas (figura 9 E). Com base nesses achados, não houve diferença na produção de LTB4 (figura 10 B), degranulação (figura 10 E) e atividade de MPO (figura 10 H), provavelmente devido à redução da infecção.

No entanto, a inibição de moléculas que participam na via de sinalização intracelular do NFkB reduziu significativamente os mecanismos de controle da infecção por *L. amazonensis*. O tratamento de neutrófilos antes da infecção com BAY, que impede a degradação do I κ B e translocação do NFkB para o núcleo, reduziu a produção de LTB4 (figura 10 C), a degranulação (figura 10 F) e a atividade de MPO (figura 10 I). Resultados similares foram obtidos quando os neutrófilos foram tratados com Wedelolactone (dados não mostrados), o inibidor inespecífico do NFkB. Em conjunto, estes achados revelam o papel do NFkB na produção de LTB4 e degranulação, ambos fundamentais para o controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos.

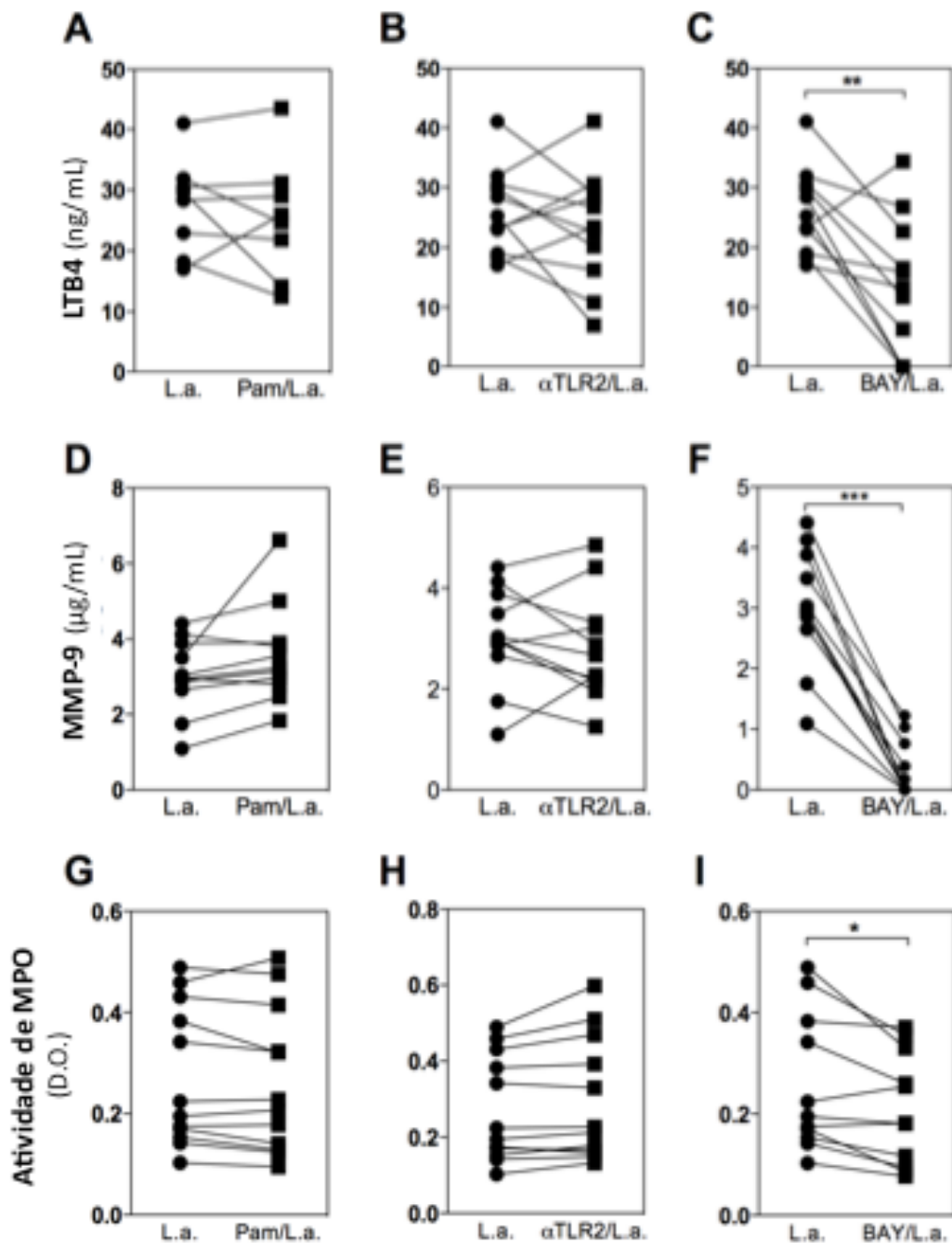


Figura 10. Mediadores responsáveis pela atividade leishmanicida de neutrófilos humanos é mediada por sinalização via NFκB. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis. As células foram infectadas na presença do Pam3CSK4 (Pam), agonista do TLR2 ou tratadas antes da infecção com anticorpo neutralizante contra TLR2 (α TLR2) ou BAY, inibidor específico do NFκB. Após a infecção por 3 horas, o sobrenadante da cultura foi coletado e avaliado para a produção de LTB4 por ELISA de competição (A – C), degranulação pela mensuração de MMP-9 liberada por ELISA sanduíche (D – F) ou atividade de MPO para substrato específico (G – I). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste *t* não-paramétrico Mann-Whitney.

Em seguida, o papel de outras vias de sinalização intracelular também foi investigado para o seu envolvimento no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos. Os resultados mostram que a atividade leishmanicida também foi significativamente reduzida por LY294002 (LY), inibidor específico da PI3k (figura 11 A). Esta enzima é induzida através de receptores de fatores de crescimento, proliferação e sobrevivência celular, levando à ativação de AKT. A molécula efetora desta via é o mTOR, implicado na regulação do crescimento celular (ALTOMARE & KHALED, 2012).

Resultados similares foram obtidos com PD98059 (PD), inibidor específico das cinases MEK1 e 2 (figura 11 B), que podem ser ativadas por TLR (GANTKE *et al.*, 2012). Com a inibição desta via, a viabilidade dos parasitos é significativamente aumentada (figura 11 B).

Por fim, a inibição da PKC com Bisindolylmaleimide (BIS), também levou à redução da capacidade leishmanicida dos neutrófilos (figura 11 C). Este resultado se deve provavelmente ao papel da PKC na formação do complexo NADPH oxidase e ativação da explosão respiratória (BERTRAM & LEY, 2011). A incubação dos neutrófilos com o solvente utilizado para diluir estes inibidores não alterou a viabilidade dos parasitas (dados não mostrados).

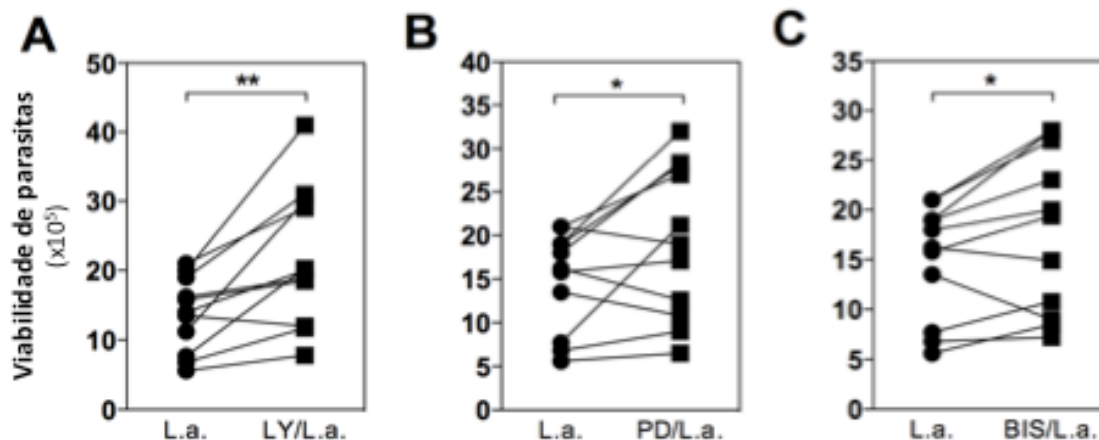


Figura 11. As vias de sinalização PI3k, MEK e PKC participam no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis. As células foram tratadas com LY294002 (LY), inibidor específico da PI3k (A), PD98059 (PD), inibidor específico das cinases MEK1 e 2 (B) ou Bisindolylmaleimide (BIS), o inibidor da via do PKC (C) por 15 minutos. Após a infecção por 3 horas, o meio de cultura celular foi substituído por meio de cultura de parasitas e cultivado por 24 horas, quando foi feita a contagem de parasitas viáveis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste t não-paramétrico Mann-Whitney.

Além disso, a produção de mediadores lipídicos e inflamatórios foi avaliada no sobrenadante das culturas de neutrófilos infectados, pré-tratados ou não com estes diferentes inibidores. A produção de LTB₄ não é alterada quando neutrófilos são tratados com LY (figura 12 A), PD (figura 12 B) ou BIS (figura 12 C). No entanto, a degranulação de MMP-9 é significativamente reduzida com a inibição de PI3k (figura 12 D) e MEK (figura 12 E). O tratamento com BIS não alterou a liberação de MMP-9 (figura 12 F). Estes achados confirmam resultados anteriores da literatura, onde a sinalização do LTB₄ é um evento anterior à sinalização por PI3k e MEK, levando à degranulação (GAUDREAU *et al.*, 2005b; ITO *et al.*, 2002) sinalizada por estes mediadores.

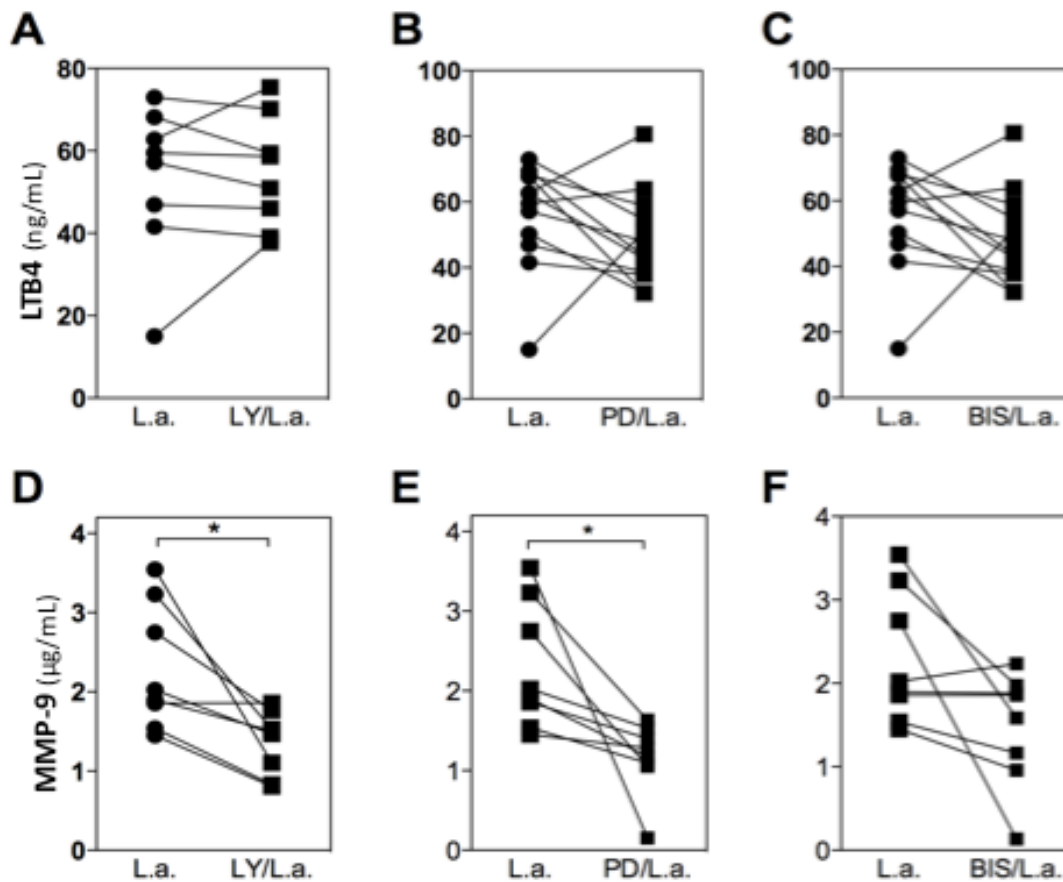


Figura 12. As vias de sinalização PI3k, MEK e PKC participam no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos induzindo degranulação mediada por LTB4. Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis. As células foram tratadas com LY294002 (LY), inibidor específico da PI3k (A, D), PD98059 (PD), inibidor específico das cinases MEK1 e 2 (B, E) ou Bisindolylmaleimide (BIS), o inibidor da via do PKC (C, F) por 15 minutos. Após a infecção por 3 horas, o sobrenadante das culturas foi coletado e avaliado para a produção de LTB4 por ELISA de competição (A - C) ou degranulação de MMP-9 por ELISA sanduíche (D - F). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste t não-paramétrico Mann-Whitney.

9.9 Identificação do receptor de LTB₄ responsável pela indução da atividade leishmanicida em neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis*.

O papel do receptor de alta afinidade do LTB₄, BLT1, foi analisado no controle da infecção por *L. amazonensis* por neutrófilos humanos. Resultados preliminares apontam que não há diferença na atividade leishmanicida quando as células foram tratadas com antagonista específico do BLT1, U75302 (U), antes da infecção (figura 13 A). No entanto, quando o receptor intracelular do LTB₄, PPAR α , foi silenciado com seu antagonista não-específico MK886 (MK), a viabilidade dos parasitas foi significativamente aumentada (figura 13 B). Estes achados preliminares sugerem a importância do LTB₄ como ligante do PPAR α e seu papel na indução da degranulação, capaz de controlar a infecção por *L. amazonensis*.

Neste contexto, a disponibilidade do LTB₄ no sobrenadante da cultura é significativamente aumentada quando os neutrófilos são pré-tratados com o antagonista do BLT1 (figura 13 C). Este resultado é provavelmente devido ao bloqueio no seqüestro do LTB₄ pelo BLT1, levando ao seu acúmulo no sobrenadante. Por outro lado, a inibição do PPAR α não alterou a produção de LTB₄ (figura 13 D), provavelmente por ser produzido antes da ativação do seu receptor e sugerindo que sua produção é independente da sinalização via PPAR α .

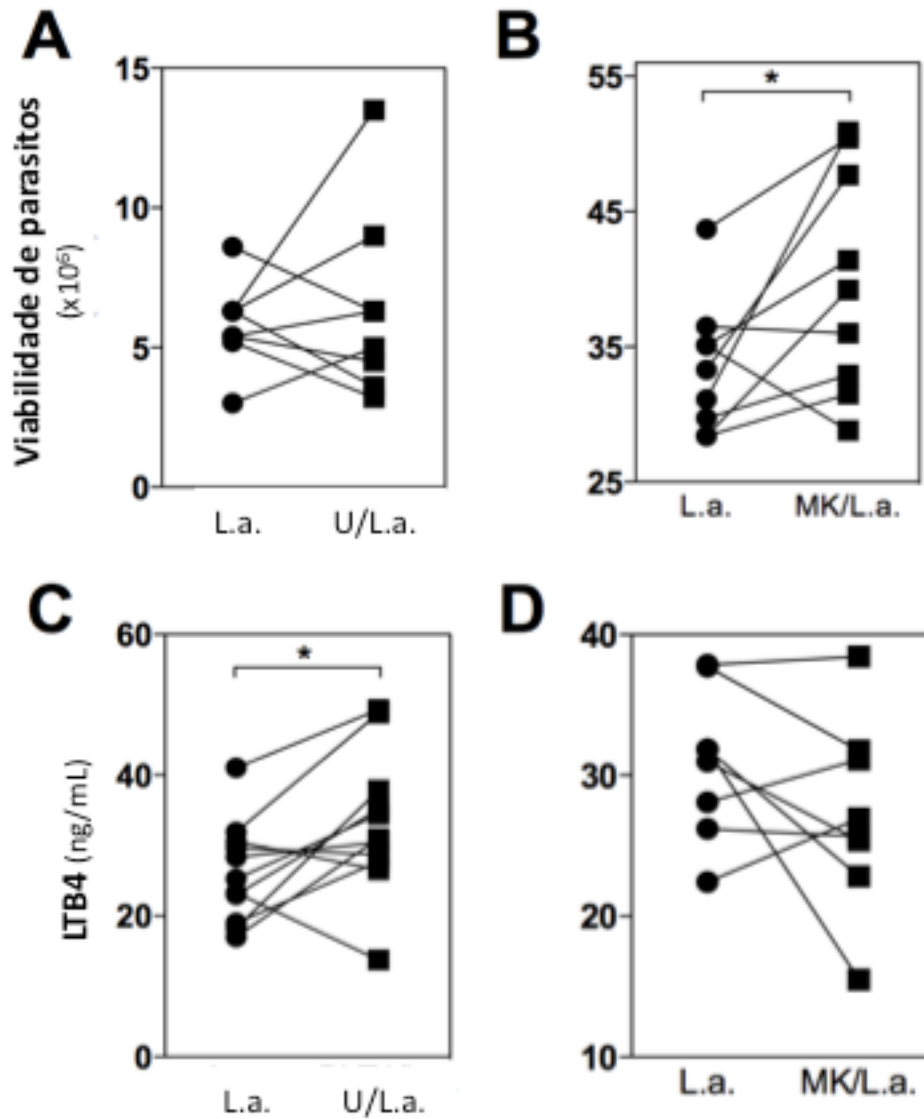


Figura 13. A atividade leishmanicida de neutrófilos humanos dependente de LTB4 pode ser mediada por PPAR α . Neutrófilos humanos foram purificados do sangue periférico de doadores saudáveis. As células foram tratadas com U75302 (U), antagonista do BLT1 (A, C, E) ou MK886 (MK), o inibidor do PPAR α (B, D, F) por 15 minutos. Após a infecção por 3 horas, o meio de cultura celular foi substituído por meio de cultura de parasitas e cultivado por 24 horas, quando foi feita a contagem de parasitas viáveis (A e B). Além disso, o sobrenadante das culturas foi coletado e avaliado para a produção de LTB4 por ELISA de competição (C e D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ pelo teste t não-paramétrico Mann-Whitney.

9.10 Proposição de modelo representativo para o mecanismo de ação do LTB₄ no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos.

Neutrófilos humanos podem reconhecer *L. amazonensis* através da interação entre seu LPG, presente na superfície do parasito, e o TLR2 na superfície das células. Este reconhecimento induz a ativação de vias de sinalização intracelular tais como PI3k – Akt, MAPk – MEK e PKC, além do NFkB. As primeiras podem induzir a degranulação direcionada para o fagossomo e também para o meio extracelular. Estas vias têm papel redundante, podendo também atuar intensificando a resposta do NFkB, que, por sua vez, induz a produção de LTB₄. O LTB₄, com múltiplas funções celulares, pode induzir aumento na expressão do TLR2, degranulação e eliminação do parasito através de mecanismos provavelmente mediados pelo seu receptor endógeno PPAR α . No entanto, o LTB₄ secretado para o meio extracelular pode atuar também através do seu principal receptor de superfície BLT1.

Estes achados indicam, portanto, o papel relevante do LTB₄ na fagocitose e resolução da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos.

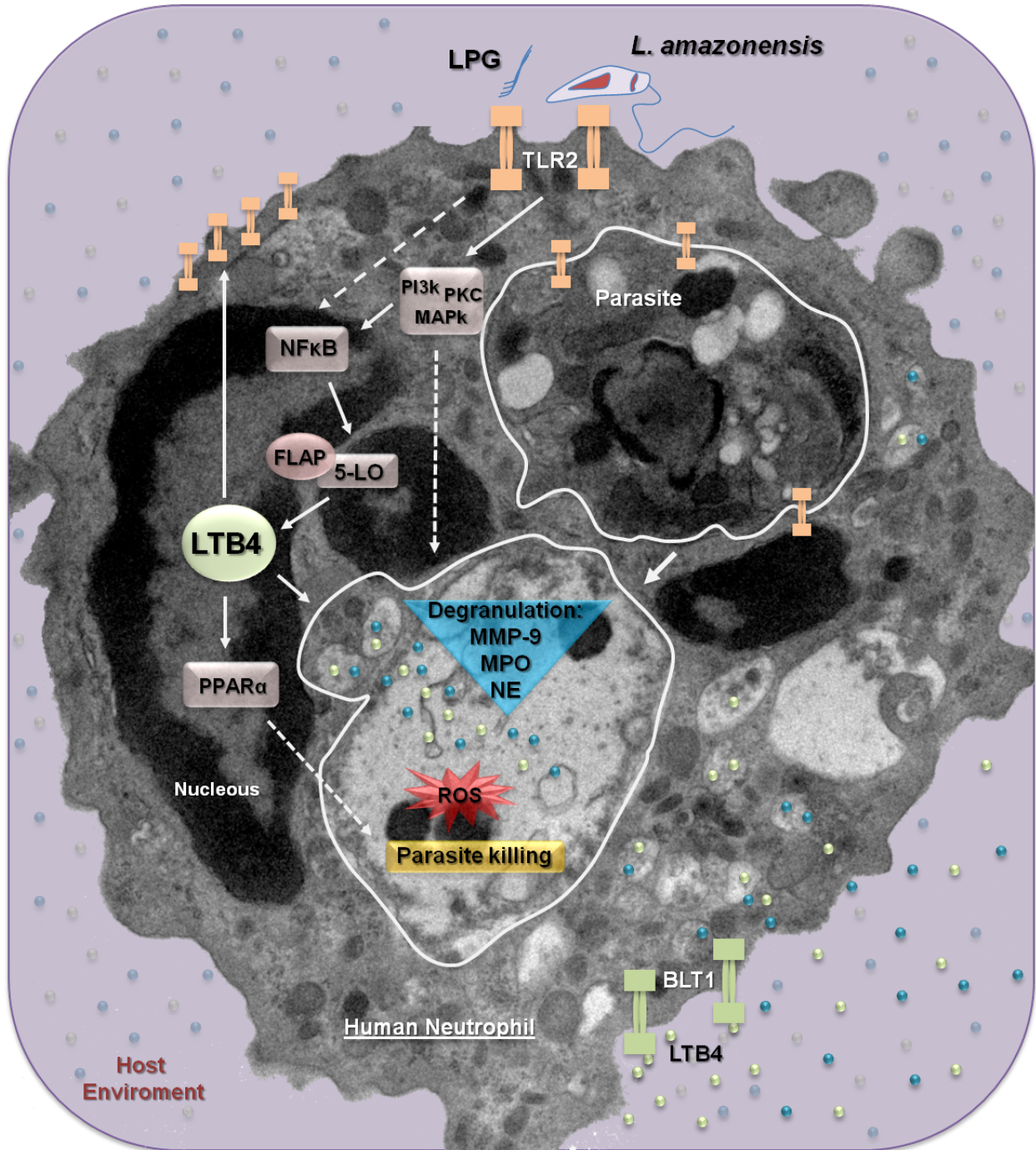


Figura 14. Modelo proposto para o mecanismo de ação do LTB4 em neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis*. Os parasitos ou seu LPG são reconhecidos por TLR2 na superfície dos neutrófilos, levando à ativação de diferentes vias intracelulares de sinalização e produção de LTB4. Possivelmente através do seu receptor endógeno, PPAR α , o LTB4 induz aumento na expressão do TLR2, degranulação para o fagossomo e para o meio extracelular.

10. DISCUSSÃO

Os resultados descritos neste estudo revelam achados importantes relacionados a muitos aspectos sobre o papel dos neutrófilos humanos no controle da infecção por *Leishmania* e, além disso, sobre a biologia dessas células. Foi demonstrado o papel essencial do LTB4 em neutrófilos humanos no controle de uma infecção patogênica. De fato, *L. amazonensis* ou seu LPG interage com TLR2, levando à ativação da via do NFκB, induzindo a produção de LTB4 e mobilização de grânulos tanto para o fagossomo quanto para o meio extracelular. Estes mecanismos são fundamentais em mediar a eliminação do parasito. Os resultados deste estudo revelam também que os efeitos mediados pelo LTB4 podem ocorrer através da sinalização pelo seu receptor endógeno PPARα.

Neutrófilos que migraram da circulação para os tecidos apresentam um perfil fenotípico ativado, que pode ser identificado com base na expressão de moléculas de superfície (Amulic et al., 2011). Foi observado que a interação entre *L. amazonensis* e neutrófilos humanos induz ativação das células, com aumento na expressão de Mac-1 na população de células GFP+ e redução na expressão de CD62L e CD16 (em ambas populações GFP+ e GFP-). Foi recentemente demonstrado que a estimulação por LPS induz populações distintas de neutrófilos baseadas em suas funções e morfologia, além da expressão de CD16 e CD62L (Pillay, J. et al., 2012). Os dados obtidos neste estudo confirmam a ativação dos neutrófilos pelo aumento na produção de ROS apenas na população GFP+. Este produto é amplamente descrito na literatura como envolvido na eliminação de parasitas (Moreira, W. et al., 2011; Shuka, A. et al., 2012). Além disso, os dados sugerem que a *L. amazonensis* é capaz de estimular células não-infectadas presentes na cultura (GFP-), uma vez que foram observadas alterações na expressão de marcadores de superfície nessa população de células. Este efeito também já foi demonstrado em células dendríticas de camundongos (Carvalho, L. et al., 2008).

Avaliou-se também a função de neutrófilos expostos à *L. amazonensis* através da análise da produção de quimiocinas, mediadores lipídicos e degranulação. Os neutrófilos respondem predominantemente à membros da família CXC de quimiocinas, como a IL-8. A infecção por *L. amazonensis* induziu produção de IL-8, CCL4 e CCL3 por neutrófilos humanos *in vitro*. De fato, resultados similares foram observados em resposta à infecção também *in vitro* por *L. major*, onde neutrófilos humanos produziram IL-8, um processo que deve favorecer o recrutamento de mais neutrófilos para o local de infecção (Van Zandbergen, G. et al., 2002). Recentemente, foi relatado o envolvimento do LTB4 na produção de IL-8 por neutrófilos humanos induzida por outro parasita protozoário, *Trichomonas vaginalis* (Nam, Y. et al., 2012). Em modelos animais, já foi demonstrado que CCL3 secretada por neutrófilos durante os momentos iniciais da infecção por *L. major* tem papel fundamental no recrutamento de células dendríticas (Charmoy et al., 2010). As células dendríticas presentes no local da infecção por *Leishmania* podem ter migrado da epiderme/derme ou terem sido recrutadas do sangue e/ou da medula óssea. Os tipos celulares podem incluir as células de Langerhans (Stoitzner et al., 2002), células dendríticas dérmicas (Shklovskaya et al., 2008) ou diferenciadas de monócitos (León et al., 2005), sugerindo também o papel relevante da CCL4, principal quimiocina responsável pelo recrutamento de monócitos (Schwartzkopff et al., 2012).

A infecção também induziu produção de LTB4, degranulação de MMP-9 e aumento na atividade da MPO. Resultados similares foram obtidos quando os neutrófilos foram pré-tratados com lipofosfoglicano (LPG) de *L. amazonensis*, uma molécula presente na superfície do parasito e que pode ser secretada. Seu papel na interação com células do hospedeiro já é bem conhecido (Ilg, T.; et al., 1994; Spath, G.; et al., 2003). O LPG tem sido implicado em múltiplas etapas necessárias para o estabelecimento da infecção em macrófagos e também na sobrevivência do parasito no inseto vetor (Ilg et al., 1994; Descoteaux and Turco, 1999; Ilgoutz and McConville, 2001; Rogers et al., 2004).

Lipoproteínas e peptidoglicanos, incluindo o LPG, são reconhecidos pelo TLR2 (Hirschfeld, M. et al., 2000; Hajjar, A. et al., 2001; Becker, I. et al., 2003; de Veer, M. et al., 2003). A relevância biológica da produção de mediadores lipídicos por neutrófilos em resposta à ligantes de TLR foi descrita em modelos de migração. Neste sistema, a migração de neutrófilos estava associada à produção de LTB₄, foi inibida pelo antagonista do receptor de LTB₄ e pelo inibidor da sua síntese (Lefebvre et al., 2010). Portanto, diante destes dados, a expressão de TLR2 e TLR4 foi avaliada na população de neutrófilos GFP+. Foi observado um aumento significativo na expressão de ambos TLR2 e TLR4 nos momentos iniciais da infecção. Tais resultados são consistentes com estudos anteriores que demonstraram aumento na expressão de TLRs após ativação de neutrófilos (Kurt-Jones et al., 2002; Kobayashi et al., 2003). No entanto, 3 horas após a infecção, apenas a expressão do TLR2 é significativamente reduzida. Este achado sugere que o TLR2 é endocitado durante a fagocitose da *Leishmania*, provavelmente mediada pela interação com o LPG. Já se sabe que, na ausência de estímulo fagocítico, a expressão do TLR2 é distribuída de modo uniforme na superfície do macrófago. Porém, após a incubação com partículas de zimozan, as membranas dos fagossomos são altamente enriquecidas com moléculas de TLR2 (Underhill et al., 1999). Este estudo demonstrou o recrutamento das moléculas de TLR2 especificamente para os fagossomos que continham levedura. Com base nestes resultados e nas nossas evidências, sugerimos que a internalização da *Leishmania* induz endocitose do TLR2 e direcionado deste receptor para o fagossomo com o parasito, levando à redução da sua expressão na superfície da célula.

A presença do LTB₄ pode induzir uma série de respostas funcionais importantes para a defesa imune do hospedeiro, tais como liberação de produtos granulares (Flamand et al., 2007), ativação do complexo NADPH oxidase, produção de NO e, principalmente, aumento na capacidade fagocítica (Mancuso and Peters-Golden, 2000). No entanto, o mecanismo responsável por este efeito ainda não está totalmente esclarecido. Com o objetivo de elucidar esta questão, avaliamos a

expressão de TLR na população de neutrófilos GFP+ previamente tratados com Zileuton, o inibidor farmacológico da 5-LO. Os resultados mostram que a expressão do TLR2 é parcialmente dependente de LTB4, uma vez que houve uma redução significativa na sua expressão com o tratamento. Por outro lado, o mesmo não foi observado em relação ao TLR4, onde não houve alteração na sua expressão. Já existem evidências indicando que a síntese de LTB4 é necessária para a expressão de MyD88 e ativação de NFkB em macrófagos murinos (Serezani et al., 2011). Além disso, o tratamento de neutrófilos humanos com LTB4 exógeno *in vitro* aumenta a resposta de TLR (Gaudreault et al., 2012). Resultados semelhantes foram observados com outros receptores de reconhecimento de padrões moleculares. A expressão da Dectina-1, uma lectina do tipo C que reconhece β -glicanos (Brown, 2006), é regulada pelo LTB4 em macrófagos de camundongos (Serezani et al., 2012). Por fim, o envolvimento do LTB4 na fagocitose da *Leishmania* foi confirmado, uma vez que houve redução na taxa de infecção e de número de parasitos internalizados nos neutrófilos previamente tratados com Zileuton, provavelmente devido à menor eficiência no reconhecimento de parasitos pela redução na expressão do TLR2.

Outros estudos já haviam relatado que o LTB4 pode induzir degranulação e conseqüentemente a eliminação de microorganismos (Flamand, L., et al., 2007; Secatto, A. et al., 2012; Serezani, C. et al., 2006). Resultados similares foram obtidos neste estudo, com aumento da viabilidade dos parasitas quando a produção de LTB4 foi inibida pelo pré-tratamento com Zileuton. Estudos anteriores também relataram que produtos da 5-LO são mediadores fundamentais para o controle de infecções por fungos (Secatto, A. et al., 2012), vírus (Gaudreault, E. et al., 2007) e parasitas (Serezani, C. et al., 2006). A inibição de produtos presentes nos grânulos, tais como MMP-9 e MPO também levou à redução na capacidade leishmanicida dos neutrófilos. Estas enzimas são essenciais para o processo de migração dos neutrófilos (Delclaux et al., 1996) e para a geração de radicais livres do oxigênio (Lacy, 2005) respectivamente. Nossos resultados estão de acordo com estes achados da literatura e reforçam o papel dessas moléculas no controle da infecção por

L. amazonensis. Por outro lado, a inibição da NE não induziu alteração na viabilidade dos parasitas. Esta enzima tem papel conhecido na clivagem de fatores de virulência presentes em enterobactérias com alta especificidade (Weinrauch et al., 2002). Além disso, camundongos deficientes em NE são altamente susceptíveis à infecções por bactérias (Belaouaj et al., 1998) e fungos (Tkalcevic et al., 2000). Na infecção por *L. major*, a NE, via TLR4, ativa macrófagos murinos, levando à eliminação de parasitas (Ribeiro-Gomes et al., 2007; Faria et al., 2011). Um outro processo no qual a NE tem papel importante é a formação da NET, uma rede fibrosa composta de DNA, histonas e NE. Já foi demonstrado que as NETs retém bactérias (Brinkmann et al., 2004) e fungos (Urban et al., 2006), e compõem um microambiente com alta concentração de moléculas microbicidas, levando à eliminação desses microorganismos. Diferentemente dos nossos achados, já foi demonstrado que a infecção por *L. amazonensis* induz a formação de NETs em neutrófilos humanos (Guimarães-Costa et al., 2009). Este estudo relata também que as NETs possuem capacidade leishmanicida. Apesar da NE ser componente das NETs, seu papel na eliminação da *L. amazonensis* não está esclarecido. Quando os neutrófilos são tratados com DNase ou anticorpo neutralizante para histonas antes da infecção, a sobrevivência dos parasitas é aumentada (Guimarães-Costa et al., 2009). O mesmo é observado em infecções por bactérias (Brinkmann et al., 2004). No entanto, o efeito que a neutralização ou a inibição da NE teria sobre a formação das NETs ou sobre a eliminação de microorganismos ainda não está definido. Nossos dados apontam que a NE não apresenta papel relevante no controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos. Além disso, a formação das NETs pode ocorrer após os fenômenos envolvidos na eliminação do parasito, sugerindo sua avaliação em tempos mais tardios.

Os achados do presente estudo também confirmaram o envolvimento do LTB4 na degranulação, que foi avaliada pela liberação de MMP-9, atividade de MPO e produção de ROS, uma vez que todos estes mediadores foram significativamente reduzidos pelo pré-tratamento com Zileuton. Os fagócitos utilizam uma ampla gama

de mecanismos microbicidas para eliminar microorganismos fagocitados e muitos destes mecanismos são ativados ou amplificados por leucotrienos (Dewald, B. & Baggiolini, M., 1985; Hubbard & Erickson, 1995; Larfars, G. et al, 1999). A análise ultraestrutural de neutrófilos infectados com *L. amazonensis* por microscopia eletrônica de transmissão confirmou este papel crucial do LTB4 no controle da infecção. Serezani e colaboradores, em 2006, estudando linhagens de camundongos resistentes e susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*, mostraram que a deficiência farmacológica e genética em leucotrienos resultou em redução da atividade leishmanicida em macrófagos (Serezani, C. et al., 2006). Este último e também outros estudos revelaram que ROS (Laufs et al., 2002; Bisti and Soteriadou, 2006) e NO (Talvani, A. et al., 2002; Balestieri, F. et al., 2002; Serezani, C. et al., 2006) são fundamentais para a atividade leishmanicida observada.

Poucos são os dados disponíveis sobre a ativação das enzimas envolvidas na formação do LTB4 induzidas por agonistas de TLR. No entanto, esclarecer essa questão é relevante porque o LTB4 tem papel fundamental no controle da infecção por *L. amazonensis*. Para isso, inibidores e agonistas foram utilizados para elucidar os mecanismos de sinalização intracelular que regulam a degranulação e a eliminação do parasito. Nossos resultados indicam que a potenciação da resposta de controle da infecção por *L. amazonensis* pode ser mediada pelo estímulo da via do TLR2. Estes resultados estão de acordo com um estudo prévio onde foi demonstrado que a sinalização via TLR2 e LTB4 aumenta a produção de citocinas por neutrófilos humanos (Gaudreault et al., 2012). A interação entre TLR e estruturas microbianas leva à internalização e direcionamento do microorganismo para o fagossomo (Blander, 2007). Uma vez que esta via de reconhecimento foi bloqueada pelo anticorpo neutralizante anti-TLR2, a taxa de infecção e também o número de parasitos fagocitados foram significativamente reduzidos. Provavelmente por conta disso, não houve alteração na produção de LTB4, degranulação e viabilidade de parasitas com a neutralização do TLR2. Estes achados, portanto, reforçam o papel do LTB4 na fagocitose pela regulação na expressão de TLR2.

O NFkB é um fator de transcrição chave para a produção de mediadores inflamatórios induzidos pela via de sinalização do TLR (Kawai and Akira, 2011). Quando esta via foi inibida, a viabilidade de parasitas foi significativamente aumentada. Esta redução na atividade leishmanicida é provavelmente devido à produção de LTB4 e degranulação reduzidas, observadas com o inibidor do NFkB. Estes resultados são semelhantes aos obtidos em estudos anteriores que demonstraram que a indução de NFkB é importante para a resposta do hospedeiro contra patógenos e que essa via também participa no controle da infecção (Pahl et al., 1996; Kawahara et al., 2001; Santoro et al., 2003; Smith et al., 2003). Além disso, o complexo IKK, que ativa o NFkB (Kumar et al., 2011), é capaz de induzir a degranulação de mastócitos mediada por IgE (Nakagomi et al., 2012). Este achado ressalta o papel do NFkB em regular a produção de LTB4 e degranulação em neutrófilos humanos.

Uma vez que receptores da imunidade inata utilizam componentes comuns para ativar uma resposta imune efetiva, suas cascatas de sinalização podem estar interconectadas. Nesse sentido, o papel de vias de sinalização tais como PI3k, MEK e PKC foi avaliado no controle da infecção por *L. amazonensis*, na produção de LTB4 e também na degranulação através do uso de inibidores farmacológicos. Foi observado um aumento significativo na viabilidade de parasitas quando estas moléculas foram inibidas. No entanto, a produção de LTB4 não foi afetada, sugerindo o papel redundante dessas vias ou que sua liberação acontece antes da ativação destas vias (Serhan and Kreydiyyeh, 2011; Xiao et al., 2013). O papel do LTB4 como uma molécula ativadora dos membros da família da MAPk já é conhecido (Tong et al., 2005; Gaudreault et al., 2012) e a PKC é diretamente envolvida em múltiplas etapas da sinalização de TLRs (Asehnoune et al., 2005; McGettrick et al., 2006; Zhou et al., 2006). A cascata de sinalização clássica induzida pela ativação de TLR envolve moléculas como MyD88 – IRAK – TAK1 (Parker et al., 2005; Lee and Kim, 2007). O LTB4 é capaz de ativar a fosforilação da proteína TAK1 e IRAK1, aumentando a intensidade da resposta dos neutrófilos aos ligantes do TLR

(Gaudreault et al., 2012). Além disso, o LTB4 é necessário para a expressão de MyD88 (Serezani et al., 2011). Por outro lado, a degranulação, mensurada pela liberação de MMP-9, é reduzida com estes tratamentos. De acordo com estes achados, o PI3k já é conhecido como um importante fator para degranulação em neutrófilos e eosinófilos humanos (Carlson et al., 2011; Kämpe et al., 2012). Esses resultados indicam o envolvimento crucial das vias PI3k, MEK e PKC na resolução da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos, principalmente através da degranulação.

O LTB4 é o agonista para dois receptores de membrana acoplados à proteína G, denominados BLT1, de alta afinidade ao LTB4, e BLT2, de baixa afinidade (Huang et al., 1998; Kamohara et al., 2000; Tryselius et al., 2000). Investigamos se o controle da infecção por *L. amazonensis* é dependente da sinalização via BLT1 em neutrófilos humanos. Diferentemente do esperado, não foram observadas diferenças na viabilidade dos parasitos quando os neutrófilos foram pré-tratados com o U75302, antagonista do BLT1. Dados da literatura mostram que a endocitose do BLT1 é um evento importante na degranulação de neutrófilos induzida por LTB4 (Gaudreault et al., 2005). Além disso, a adição de LTB4 exógeno aumenta a atividade leishmanicida de macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* e este efeito é dependente do BLT1 (Serezani et al., 2006). Apesar destes achados ressaltarem o papel do BLT1 na sinalização do LTB4, este foi recentemente identificado como um agonista endógeno para o receptor PPAR α (Narala et al., 2010). Com a utilização do inibidor farmacológico deste receptor, mas que também atua na FLAP, foi observada uma redução na capacidade leishmanicida dos neutrófilos, sugerindo que os mecanismos envolvidos no controle da infecção por *L. amazonensis* podem ser dependentes do PPAR α . A importância da resposta imune induzida pela ativação do PPAR α foi recentemente demonstrada em pacientes com choque séptico, onde a expressão do PPAR α era reduzida e isto estava correlacionado com a gravidade da doença. Em modelos experimentais de sepse, camundongos deficientes em PPAR α tinham redução na sobrevivência (Standage et al., 2012). Estes achados sugerem que o

PPAR α pode ter papel significativo na manutenção da resposta imune apropriada para o controle da infecção. A produção de LTB4 não é alterada com a inibição do PPAR α , uma vez que sua produção acontece antes da ativação do seu receptor (Narala et al., 2010). Por outro lado, há maior disponibilidade de LTB4 quando as células são tratadas com o inibidor do BLT1, provavelmente por impedir seu seqüestro pelo receptor, levando ao acúmulo do LTB4 no meio extracelular.

No presente estudo, foi demonstrado o papel essencial do LTB4 em potencializar a resposta imune induzida pela sinalização via TLR e também na indução da degranulação, direcionada para o fagossomo e para o meio extracelular, fundamental para o controle da infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos humanos (figura 14).

11. CONCLUSÕES

- *Leishmania amazonensis* ou seu LPG induzem liberação dos conteúdos granulares e produção de LTB4 por neutrófilos humanos;
- O LTB4 induz a eliminação de *L. amazonensis* por neutrófilos humanos;
- A expressão do TLR2 nos neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis* é parcialmente regulada pelo LTB4;
- A via de sinalização intracelular do NFkB, bem como o receptor endógeno do LTB4, PPAR α , podem contribuir para a eliminação dos parasitos mediada pelo LTB4 em neutrófilos humanos.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, Lilian *et al.* Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 84, n. August, 2008.

AGA, Eresso *et al.* Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 169, n. 2, p. 898-905, 15 jul. 2002.

AKIRA, S; HOSHINO, K; KAISHO, T. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *Journal of endotoxin research*, v. 6, n. 5, p. 383-7, jan. 2000.

ALTOMARE, D A; KHALED, A R. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. *Current medicinal chemistry*, v. 19, n. 22, p. 3748-62, jan. 2012.

AMULIC, Borko *et al.* Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual review of immunology*, n. December 2011, 24 mar. 2011.

BAILIE, Marc B *et al.* leukotriene-Deficient Mice Manifest Enhanced lethality from. 1996.

BARRAL, A *et al.* Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 53, n. 3, p. 256-9, set. 1995.

BEIL, W J *et al.* Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *Journal of leukocyte biology*, v. 52, n. 2, p. 135-42, ago. 1992.

BERTRAM, Anna; LEY, Klaus. Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, v. 59, n. 2, p. 79-87, abr. 2011.

BORREGAARD, N *et al.* Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *Journal of leukocyte biology*, v. 56, n. 1, p. 80-7, jul. 1994.

BORREGAARD, N; COWLAND, J B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, v. 89, n. 10, p. 3503-21, 15 maio 1997.

BORREGAARD, Niels. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, v. 33, n. 5, p. 657-70, 24 nov. 2010.

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

BROGDEN, Kim A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 238-50, mar. 2005.

CAMPBELL, J J *et al.* Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science (New York, N.Y.)*, v. 279, n. 5349, p. 381-4, 16 jan. 1998.

CARVALHO, E M *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica*, v. 56, n. 4, p. 315-25, abr. 1994.

CARVALHO, Lucas P; PEARCE, Edward J; SCOTT, Phillip. Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF-alpha, whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 181, n. 9, p. 6473-80, 1 nov. 2008.

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

CHEN, Lin *et al.* The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitology international*, v. 54, n. 2, p. 109-18, jun. 2005.

COELHO-FINAMORE, J M *et al.* *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *International journal for parasitology*, v. 41, n. 3-4, p. 333-42, mar. 2011.

CONSTANTIN, G *et al.* Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*, v. 13, n. 6, p. 759-69, dez. 2000.

CORBIN, Brian D *et al.* Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science (New York, N.Y.)*, v. 319, n. 5865, p. 962-5, 15 fev. 2008.

DE ASSIS, Rafael Ramiro *et al.* Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1820, n. 9, p. 1354-65, set. 2012.

DELCLAUX, C *et al.* Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, v. 14, n. 3, p. 288-95, mar. 1996.

DESJEUX, Philippe. Leishmaniasis. *Nature reviews. Microbiology*, v. 2, n. 9, p. 692, set. 2004.

DOYLE, Sean E *et al.* Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. *The Journal of experimental medicine*, v. 199, n. 1, p. 81-90, 5 jan. 2004.

EZEKOWITZ, R A *et al.* Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 172, n. 6, p. 1785-94, 1 dez. 1990.

FAURSCHOU, Mikkel; BORREGAARD, Niels. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 5, n. 14, p. 1317-27, nov. 2003.

FLANNAGAN, Ronald S *et al.* Dynamic macrophage "probing" is required for the efficient capture of phagocytic targets. *The Journal of cell biology*, v. 191, n. 6, p. 1205-18, 13 dez. 2010.

GANTKE, Thorsten *et al.* I κ B kinase regulation of the TPL-2/ERK MAPK pathway. *Immunological reviews*, v. 246, n. 1, p. 168-82, mar. 2012.

GANTNER, Benjamin N *et al.* Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of experimental medicine*, v. 197, n. 9, p. 1107-17, 5 maio 2003.

GAUDREAU, Eric *et al.* Involvement of BLT1 endocytosis and Yes kinase activation in leukotriene B₄-induced neutrophil degranulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 174, n. 6, p. 3617-25, 15 mar. 2005a.

GAUDREAU, Eric *et al.* Involvement of BLT1 endocytosis and Yes kinase activation in leukotriene B₄-induced neutrophil degranulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 174, n. 6, p. 3617-25, 15 mar. 2005b.

GAUDREAU, Eric; GOSSELIN, Jean. Leukotriene B₄-mediated release of antimicrobial peptides against cytomegalovirus is BLT1 dependent. *Viral immunology*, v. 20, n. 3, p. 407-20, set. 2007.

GRIMALDI, G; DAVID, J R; MCMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using

monoclonal antibodies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 36, n. 2, p. 270-87, mar. 1987.

GUEIRARD, Pascale *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. 100-11, jan. 2008.

HAMPTON, M B; KETTLE, A J; WINTERBOURN, C C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, v. 92, n. 9, p. 3007-17, 1 nov. 1998.

HAZEKI, Kaoru *et al.* Toll-like receptor-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin via MyD88-dependent and -independent pathways. *European journal of immunology*, v. 33, n. 3, p. 740-7, mar. 2003.

HERRE, Jurgen *et al.* Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood*, v. 104, n. 13, p. 4038-45, 15 dez. 2004.

HUME, Alistair N *et al.* The leaden gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, v. 3, n. 3, p. 193-202, mar. 2002.

ITO, Nobuko *et al.* Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B₄-induced enzyme release. *The Journal of biological chemistry*, v. 277, n. 47, p. 44898-904, 22 nov. 2002.

JAUMOUILLE, Valentin; GRINSTEIN, Sergio. Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. *Current opinion in cell biology*, v. 23, n. 1, p. 22-9, fev. 2011.

KANSAS, G S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, v. 88, n. 9, p. 3259-87, 1 nov. 1996.

KENNEDY, Adam D; DELEO, Frank R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunologic research*, v. 43, n. 1-3, p. 25-61, 2009.

KJELDSEN, L *et al.* Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *The Biochemical journal*, v. 287 (Pt 2, p. 603-10, 15 out. 1992.

KOBAYASHI, Scott D *et al.* Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *Journal of leukocyte biology*, v. 78, n. 6, p. 1408-18, dez. 2005.

KRESS, Holger *et al.* Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 28, p. 11633-8, 10 jul. 2007.

LACY, Paige. The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. *Pharmacology & therapeutics*, v. 107, n. 3, p. 358-76, set. 2005.

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

LASKAY, Tamás; VAN ZANDBERGEN, Ger; SOLBACH, Werner. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in microbiology*, v. 11, n. 5, p. 210-4, maio 2003.

LAUFS, Helmut *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. 826-35, mar. 2002.

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

LÖTZER, Katharina; FUNK, Colin D; HABENICHT, Andreas J R. The 5-lipoxygenase pathway in arterial wall biology and atherosclerosis. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1736, n. 1, p. 30-7, 5 set. 2005.

LUSTER, Andrew D; TAGER, Andrew M. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. *Nature reviews. Immunology*, v. 4, n. 9, p. 711-24, set. 2004.

MALAVIYA, R; ABRAHAM, S N. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *Journal of leukocyte biology*, v. 67, n. 6, p. 841-6, jun. 2000.

MANCUSO, Peter *et al.* 5-Lipoxygenase Reaction Products Modulate Alveolar Macrophage Phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae* 5-Lipoxygenase Reaction Products Modulate Alveolar Macrophage Phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Society*, 1998.

MARSDEN, P D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 6, p. 859-76, jan. 1986.

MCEVER, R P; CUMMINGS, R D. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *The Journal of clinical investigation*, v. 100, n. 3, p. 485-91, 1 ago. 1997.

MEDEIROS, A I *et al.* Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. *British journal of pharmacology*, v. 128, n. 7, p. 1529-37, dez. 1999.

MEDEIROS, Alexandra I *et al.* Blockade of Endogenous Leukotrienes Exacerbates Pulmonary Histoplasmosis Blockade of Endogenous Leukotrienes Exacerbates Pulmonary Histoplasmosis. 2004.

MEDEIROS, Alexandra I *et al.* Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 181, n. 12, p. 8544-51, 15 dez. 2008.

MILANO, S *et al.* Ex vivo evidence for PGE2 and LTB4 involvement in cutaneous leishmaniasis: relation with infection status and cytokine production. *Parasitology*, v. 112 (Pt 1, p. 13-9, jan. 1996.

MUELLER, Helena *et al.* Tyrosine kinase Btk regulates E-selectin-mediated integrin activation and neutrophil recruitment by controlling phospholipase C (PLC) gamma2 and PI3Kgamma pathways. *Blood*, v. 115, n. 15, p. 3118-27, 15 abr. 2010.

NARALA, Venkata R *et al.* Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist. *The Journal of biological chemistry*, v. 285, n. 29, p. 22067-74, 16 jul. 2010.

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

OKAMOTO, Fuyuki *et al.* Leukotriene B4 augments and restores Fc gammaRs-dependent phagocytosis in macrophages. *The Journal of biological chemistry*, v. 285, n. 52, p. 41113-21, 24 dez. 2010.

PARKER, Lisa C *et al.* The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *Journal of Leukocyte Biology*, 2005.

PATEL, Prerna C; HARRISON, Rene E. Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages. *Molecular biology of the cell*, v. 19, n. 11, p. 4628-39, nov. 2008.

PEISER, Leanne; MUKHOPADHYAY, Subhankar; GORDON, Siamon. Scavenger receptors in innate immunity. *Current opinion in immunology*, v. 14, n. 1, p. 123-8, fev. 2002.

PERES, Camila M *et al.* Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 179, n. 8, p. 5454-61, 15 out. 2007.

PETERS, Nathan C *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science (New York, N.Y.)*, v. 321, n. 5891, p. 970-4, ago. 2008.

PETERS-GOLDEN, M; BROCK, T G. 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, v. 69, n. 2-3, p. 99-109, 2003.

PETERS-GOLDEN, Marc *et al.* Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 174, n. 2, p. 589-94, 15 jan. 2005.

PETERS-GOLDEN, Marc; HENDERSON, William R. Leukotrienes. *The New England Journal of Medicine*, n. 357, p. 1841-1854, 2007.

RAVETCH, J V; BOLLAND, S. IgG Fc receptors. *Annual review of immunology*, v. 19, p. 275-90, jan. 2001.

REINER, N E; MALEMUD, C J. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 134, n. 1, p. 556-63, jan. 1985.

REINER, N E; MALEMUD, C J. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (*Donovani*): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. *Cellular immunology*, v. 88, n. 2, p. 501-10, 15 out. 1984.

RIBEIRO-GOMES, Flavia L *et al.* Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS pathogens*, v. 8, n. 2, p. e1002536, fev. 2012.

RIBEIRO-GOMES, Flávia L *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 172, n. 7, p. 4454-62, abr. 2004.

RODRÍGUEZ, Nilda E; GAUR, Upasna; WILSON, Mary E. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. *Cellular microbiology*, v. 8, n. 7, p. 1106-20, jul. 2006.

RUBIN-BEJERANO, Ifat *et al.* Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 19, p. 11007-12, 16 set. 2003.

SABROE, Ian; DOWER, Steven K; WHYTE, Moira K B. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 41 Suppl 7, n. Suppl 7, p. S421-6, 15 nov. 2005.

SAVILL, J; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, v. 407, n. 6805, p. 784-8, out. 2000.

SCHIFF, D E *et al.* Phagocytosis of gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism. *Journal of leukocyte biology*, v. 62, n. 6, p. 786-94, dez. 1997.

SCHROEDER, Bjoern O *et al.* Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1. *Nature*, v. 469, n. 7330, p. 419-23, 20 jan. 2011.

SECATTO, Adriana *et al.* 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. *PloS one*, v. 7, n. 3, p. e31701, jan. 2012.

SELVATICI, Rita *et al.* Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *European journal of pharmacology*, v. 534, n. 1-3, p. 1-11, 18 mar. 2006.

SENGELØV, H *et al.* Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, v. 92, n. 3, p. 1467-76, set. 1993.

SEREZANI, Carlos H *et al.* Leukotrienes are essential for the control of Leishmania amazonensis infection and contribute to strain variation in susceptibility. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 177, n. 5, p. 3201-8, 1 set. 2006.

SEREZANI, Carlos H C *et al.* Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against Klebsiella pneumoniae through the activation of NADPH oxidase. *Blood*, v. 106, n. 3, p. 1067-75, 1 ago. 2005.

SHI, Shuangping *et al.* MyD88 primes macrophages for full-scale activation by interferon-gamma yet mediates few responses to Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of experimental medicine*, v. 198, n. 7, p. 987-97, 6 out. 2003.

STÄGER, Simona; JOSHI, Trupti; BANKOTI, Rashmi. Immune evasive mechanisms contributing to persistent Leishmania donovani infection. *Immunologic research*, v. 47, n. 1-3, p. 14-24, jul. 2010.

SWEET, M J; HUME, D A. Endotoxin signal transduction in macrophages. *Journal of leukocyte biology*, v. 60, n. 1, p. 8-26, jul. 1996.

TACCHINI-COTTIER, F *et al.* An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 165, n. 5, p. 2628-36, 1 set. 2000.

TAGER, Andrew M; LUSTER, Andrew D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, v. 69, n. 2-3, p. 123-34, 2003.

TALVANI, A *et al.* Leukotriene B 4 Induces Nitric Oxide Synthesis in *Trypanosoma cruzi*-Infected Murine Macrophages and Mediates Resistance to Infection
Leukotriene B 4 Induces Nitric Oxide Synthesis in *Trypanosoma cruzi*-Infected Murine Macrophages and Mediates Resistance t. 2002.

TORCHINSKY, Miriam Beer *et al.* Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature*, v. 458, n. 7234, p. 78-82, 5 mar. 2009.

UNDERHILL, David M; GANTNER, Benjamin. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 6, n. 15, p. 1368-73, dez. 2004.

UNDERHILL, David M; OZINSKY, Adrian. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology*, v. 20, p. 825-52, jan. 2002.

VAN ZANDBERGEN, Ger *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 173, n. 11, p. 6521-5, 1 dez. 2004.

VIVARINI, Aislan de Carvalho *et al.* Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 25, n. 12, p. 4162-73, dez. 2011.

WEINRAUCH, Yvette *et al.* Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*, v. 417, n. 6884, p. 91-4, 2 maio 2002.

WHYTE, M K *et al.* Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 150, n. 11, p. 5124-34, 1 jun. 1993.

WILSON, M E; PEARSON, R D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infection and immunity*, v. 56, n. 2, p. 363-9, mar. 1988.

WINTERBOURN, Christine C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature chemical biology*, v. 4, n. 5, p. 278-86, maio 2008.

WIRTH, J J; KIERSZENBAUM, F. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 134, n. 3, p. 1989-93, mar. 1985.

YONG, By Elenita C; CHI, Emil Y. *Toxoplasma gondii*. v. 180, n. November, 1994.

ZARBOCK, Alexander; LEY, Klaus. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *The American journal of pathology*, v. 172, n. 1, p. 1-7, jan. 2008.

ZYCHLINSKY, Arturo; WEINRAUCH, Yvette; WEISS, Jerrold. Introduction: Forum in immunology on neutrophils. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 5, n. 14, p. 1289-91, nov. 2003.