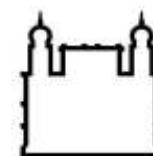




**UFBA**

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



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INFECTADOS POR  
*Leishmania infantum*: PAPEL DO HEME E DO LIPOFOSFOGLICANO (LPG)**

**GRAZIELE QUINTELA DE CARVALHO**

**Salvador – Bahia  
2019**

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INFECTADOS POR  
*LEISHMANIA INFANTUM*: PAPEL DO HEME E DO LIPOFOSFOGLICANO  
(LPG)**

Orientadora: Dra. Valéria de Matos Borges

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia  
2019**

Título da Tese: "MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INFECTADOS POR *Leishmania infantum*: PAPEL DO HEME E DO LIPOFOSFOGLICANO (LPG)"

Graziele Quintela de Carvalho

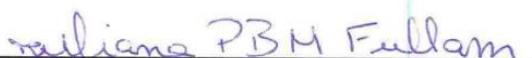
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 05 de julho de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



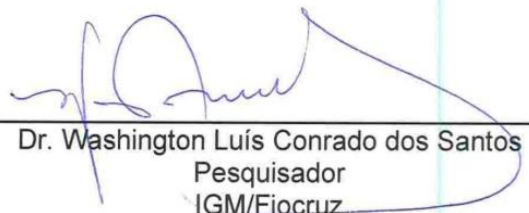
\_\_\_\_\_  
Dra. Natália Barbosa Carvalho  
Professora  
UFBA



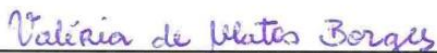
\_\_\_\_\_  
Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes  
Fullam  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



\_\_\_\_\_  
Dr. Lucas Pedreira de Carvalho  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ



\_\_\_\_\_  
Dr. Washington Luís Conrado dos Santos  
Pesquisador  
IGM/Fiocruz



\_\_\_\_\_  
Dra. Valéria de Matos Borges  
Pesquisadora  
IGM/Fiocruz

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001”

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB



Àqueles que fazem parte do que eu sou, que têm de mim o meu melhor:

Arthur, Thiago, Selma, Pereira e João.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me presentear com a vida que tenho, pelas minhas conquistas e pessoas boas que tenho em meu caminho;

Aos meus pais, Selma e Antonio, pelos sacrifícios, dedicação e amor incondicional;

Ao meu irmão João e aos meus familiares, pelo apoio;

A tio Dival e tia Célia, pelo carinho, por se fazerem sempre presentes;

Ao meu esposo, Thiago, por todo incentivo, companheirismo e amor;

Ao meu filho, Arthur, que mesmo sem saber, me faz ser melhor todos os dias;

A minha orientadora, Dra. Valéria Borges, por ser tudo aquilo que se espera de uma orientadora: competente, atenciosa e compreensiva. Obrigada por ajudar na minha formação pessoal e acadêmica;

Ao Dr. Bruno Andrade, pela disponibilidade e contribuições científicas;

Ao Dr. Albert Descoteaux, pela colaboração e discussões;

A Dra. Nívea Luz, Dr. Jonilson Lima e Dra. Sayonara Melo, pela ajuda na bancada, sugestões e ensinamentos;

A Ma. Milena, Astrid e Vanessa, por estarem dispostas a aprender e ajudar;

Aos valerianos e todos do LIM1 e LIB, por criarem um ambiente agradável de trabalho;

A todos meus amigos, por compartilhar risadas e bons momentos;

Ao Instituto Federal de Ensino e Tecnologia Baiano;

Ao PGPAT e ao Instituto Gonçalo Moniz – IGM, FIOCRUZ/BA;

A Biblioteca do IGM;

A todos que puderam contribuir para realização desse trabalho, sempre serei muito grata!

CARVALHO, Grazielle Quintela de. Mecanismos de ativação de neutrófilos infectados por *Leishmania infantum*: papel do heme e do lipofosfoglicano (LPG). 2019. 77 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Leishmaniose Visceral (LV) está entre as zoonoses mais relevantes transmitidas por vetores. Os pacientes graves com LV apresentam distúrbios sanguíneos gerando dano celular e consequente degradação de heme-proteínas que irão liberar o heme. O heme livre pode ser capaz de alterar o comportamento de neutrófilos bem como moléculas associadas à *Leishmania*, a exemplo do lipofosfoglicano (LPG). **OBJETIVO:** Avaliar como o heme e o LPG do parasito interferem na infecção de neutrófilos humanos por *Leishmania infantum*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Inicialmente, foram utilizadas amostras de soros de pacientes com LV para correlacionar os níveis de heme com a contagem de neutrófilos no sangue periférico. Em ensaios *in vitro*, foi observado como a presença do heme intervém na sobrevivência e na ativação dos neutrófilos humanos infectados com *L. infantum* através da citometria de fluxo e ensaio colorimétrico, respectivamente. Com o uso de microscópio de luz, foi feita a contagem em lâminas de neutrófilos infectados por *L. infantum* em presença do heme e a viabilidade desses parasitos foi mensurada pela contagem de promastigotas viáveis liberados em meio de cultivo. Para estudo da relação do LPG de *L. infantum* com neutrófilos, neutrófilos humanos foram infectados com parasitos deficientes para LPG ( $\Delta lpg1$ ) para comparar com a infecção de promastigotas selvagens (WT) ou de parasitos que tiveram o seu LPG reconstituído ( $\Delta lpg1+LPG1$ ). A carga parasitária e a viabilidade foram analisadas seguindo a metodologia já citada acima. O status de ativação dos neutrófilos infectados foi avaliado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por citometria de fluxo. **RESULTADOS:** Em pacientes com LV há uma associação direta entre os níveis de heme e neutropenia. Nos ensaios *in vitro*, o heme reduz a sobrevivência dos neutrófilos humanos infectados com *L. infantum* através da produção de ROS e liberação de enzimas neutrofílicas, ao mesmo tempo em que favorece a viabilidade do parasito. Os neutrófilos infectados em presença de heme mostraram aumento na atividade enzimática da superóxido dismutase-1 (SOD-1) e com interferência nas vias oxidativas houve redução da taxa de proliferação da *L. infantum* nestas células. Nos ensaios realizados para análise da interação LPG-neutrófilo, a ausência do LPG em *L. infantum*  $\Delta lpg1$  aumentou a taxa de infecção, mas favoreceu a mortalidade dessas formas em neutrófilos em comparação aos WT ou  $\Delta lpg1+LPG1$ . No que se refere à ativação dos neutrófilos, houve uma produção expressiva de ROS nas culturas infectadas com *L. infantum*  $\Delta lpg1$ , capaz de modular a sobrevivência desses promastigotas. **CONCLUSÃO:** Neutrófilos humanos sofrem influência do heme à favor da inflamação e sobrevivência do parasito, enquanto que a interação

com o LPG da *Leishmania* reforça a molécula como fator de virulência e de proteção a resposta oxidativa. Esses achados estimulam novas interpretações no contexto da LV e evidenciam a complexidade das interações neutrófilo-parasito a depender do estímulo.

**Palavras-chave:** Neutrófilo, *Leishmania*, Heme, LPG.

CARVALHO, Grazielle Quintela de. Mechanisms of activation of neutrophils infected by *Leishmania infantum*: role of heme and lipofosfoglicano (LPG). 2019. 77 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Visceral Leishmaniasis (VL) is among the most relevant zoonoses transmitted by vectors. Severe patients with VL present blood disorders generating cell damage and consequent degradation of heme-proteins that will release heme. Free heme may be able to alter the behavior of neutrophils as well as *Leishmania*-associated molecules, such as lipophosphoglycan (LPG). **OBJECTIVE:** To evaluate how the heme and LPG-parasite interfere with the infection of human neutrophils by *Leishmania infantum*. **MATERIALS AND METHODS:** Serum samples from VL patients were initially used to correlate heme levels with peripheral blood neutrophil counts. In *in vitro* assays was observed how the presence of heme intervenes in survival and activation of *L. infantum*-infected human neutrophil by flow cytometry and colorimetric assay, respectively. Using a light microscope, *L. infantum*-infected neutrophil slides were counted in the presence of heme and the viability of these parasites was measured by counting viable promastigotes released in culture medium. To study the relationship of *L. infantum* LPG with neutrophils, human neutrophils were infected with LPG-deficient parasites ( $\Delta lpg1$ ) to compare with infection of wild promastigotes (WT) or parasites that had their reconstituted LPG ( $\Delta lpg1$ +LPG1). Parasitic load and viability were analyzed following the methodology already mentioned above. Activation status of infected neutrophils was assessed by reactive oxygen species (ROS) production by flow cytometry. **RESULTS:** In patients with VL there is a direct association between heme levels and neutropenia. In *in vitro* assays, heme reduces survival of *L. infantum*-infected human neutrophils by producing ROS and releasing neutrophil enzymes, while favoring parasite viability. The neutrophils infected in the presence of heme showed an increase in the enzymatic activity of superoxide dismutase-1 (SOD-1) and interference with oxidative pathways reduced the proliferation rate of *L. infantum* in these cells. In assays performed to analyze the LPG-neutrophil interaction, the absence of LPG in the *L. infantum*  $\Delta lpg1$  increased the infection rate, but favored the mortality of these forms in neutrophils compared to WT or  $\Delta lpg1$ +LPG1. Regarding neutrophil activation, there was an expressive production of ROS in cultures infected with *L. infantum*  $\Delta lpg1$ , capable of modulating the survival of these promastigotes. **CONCLUSION:** Human neutrophils are influenced by heme in favor of inflammation and survival of the parasite, while interaction with LPG-*Leishmania* reinforces the molecule as a virulence and protective factor for oxidative response. These findings stimulate new interpretations in the context of VL and highlight the complexity of neutrophil-parasite interactions depending on the stimulus.

**Keywords:** Neutrophil, *Leishmania*, Heme, LPG.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação da via heme/HO-1.	15
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.	16
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo do glicocálix das formas promastigotas de <i>Leishmania</i> .	17
<b>Figura 4.</b> Estrutura do Lipofosfoglicano (LPG) da <i>Leishmania</i> .	18
<b>Figura 5.</b> Tipos de LPG em diferentes cepas da espécie <i>L. infantum</i> .	18
<b>Figura 6.</b> Infecção de neutrófilos com cepa Bh46 ou com cepa Ba262 de <i>L. infantum</i> deficientes de LPG.	49
<b>Figura 7.</b> Viabilidades dos promastigotas de <i>L. infantum</i> liberados em meio HOMEM após a infecção de neutrófilos.	50
<b>Figura 8.</b> Infecção de neutrófilos com <i>L. infantum</i> WT ou deficiente de LPG analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET).	51
<b>Figura 9.</b> Redução da viabilidade da <i>L. infantum</i> $\Delta lpg1$ devido à formação de vacúolos parasitóforos ácidos em neutrófilos.	52
<b>Figura 10.</b> A infecção por <i>L. infantum</i> $\Delta lpg1$ modula a expressão de marcadores de superfície em neutrófilos humanos.	54
<b>Figura 11.</b> Ativação dos neutrófilos humanos devido à infecção com <i>L. infantum</i> $\Delta lpg1$ .	55
<b>Figura 12.</b> O pré-tratamento de neutrófilos com Apocinina favorece a sobrevivência de <i>L. infantum</i> $\Delta lpg1$ por redução de ROS.	57
<b>Figura 13.</b> Dano celular em neutrófilos infectados com <i>L. infantum</i> $\Delta lpg1$ .	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>CFSE</b>	5(6)-Éster de carboxifluoresceína succinimidil, do inglês " <i>Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester</i> "
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DHE</b>	" <i>Dihydroethidium</i> "
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, do inglês " <i>deoxyribonucleic acid</i> "
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático, do inglês " <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> "
<b>GIPL</b>	Glicoinositolfosfolípidios
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HO</b>	Heme-oxigenase
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase, do inglês " <i>Lactate Dehydrogenase</i> "
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>MAC-1</b>	antígeno macrófago, do inglês " <i>Macrophage-1 Antigen</i> "
<b>MMP</b>	Metaloproteinase
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
<b>NE</b>	Elastase neutrofílica
<b>NET</b>	" <i>Neutrophils Extracellular Traps</i> "
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio, do inglês " <i>Reactive oxygen species</i> "
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
1.1	ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE	13
1.2	O GRUPAMENTO HEME	14
1.3	CICLO DE VIDA DA <i>LEISHMANIA</i>	16
1.4	O LIPOFOSFOGLICANO DA <i>LEISHMANIA</i>	17
1.5	NEUTRÓFILOS, A PRIMEIRA LINHA DE DEFESA	20
1.6	INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E <i>LEISHMANIA</i>	22
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	24
<b>3.</b>	<b>PARTE I</b>	25
3.1	HIPÓTESE	25
3.2	OBJETIVOS	25
3.2.1	<b>Objetivo Geral</b>	25
3.2.2	<b>Objetivos Específicos</b>	25
3.3	MANUSCRITO I	26
<b>4.</b>	<b>PARTE II</b>	39
4.1	HIPÓTESE	39
4.2	OBJETIVOS	39
4.2.1	<b>Objetivo Geral</b>	39
4.2.2	<b>Objetivos Específicos</b>	39
4.3	MANUSCRITO II	40
4.4	INTRODUÇÃO	41
4.4.1	<b>A Molécula de Lipofosfoglicano (LPG)</b>	41
4.4.2	<b>LPG e sua Relação com os Neutrófilos</b>	42
4.5	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.5.1	<b>Obtenção De Neutrófilos Humanos</b>	44
4.5.2	<b>Obtenção das Cepas de <i>L. infantum</i> Deficientes de LPG ou Geneticamente Restituídas</b>	44
4.5.3	<b>Cultivo de <i>L. infantum</i></b>	45
4.5.4	<b>Marcação de <i>L. infantum</i> com CFSE</b>	46
4.5.5	<b>Padronização da Infecção</b>	45
4.5.6	<b>Viabilidade por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</b>	45



4.5.7	<b>Marcação para Identificação de Vacúolo Ácido</b>	46
4.5.8	<b>Inibição da Liberação de Enzimas Lisossomais</b>	46
4.5.9	<b>Quantificação da Carga Parasitária de Neutrófilos Infectados por <i>L. infantum</i></b>	46
4.5.10	<b>Caracterização do Status de Ativação dos Neutrófilos</b>	47
4.5.11	<b>Inibição da Resposta Oxidativa</b>	48
4.5.12	<b>Detecção de Dano Celular</b>	48
4.5.13	<b>Análise Estatística</b>	48
4.6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	49
4.6.1	<b>Quantificação da Carga Parasitária e de Parasitos Viáveis de <i>L. infantum</i> WT, <math>\Delta lpg1</math> ou <math>\Delta lpg1</math>+LPG1 em Neutrófilos Humanos</b>	49
4.6.2	<b>Identificação de Vacúolos Lisossomais em Neutrófilos Humanos durante a Infecção por <i>L. infantum</i> <math>\Delta lpg1</math></b>	51
4.6.3	<b>Avaliação do Perfil de Ativação de Neutrófilos Humanos Infectados com <i>L. infantum</i> WT, <math>\Delta lpg1</math> ou <math>\Delta lpg1</math>+LPG1</b>	53
4.6.4	<b>Modulação da Resposta Oxidativa para o Controle da Infecção de <i>L. infantum</i> <math>\Delta lpg1</math> em Neutrófilos Humanos</b>	56
4.6.5	<b>Efeito do LPG de Superfície da <i>L. infantum</i> na Integridade dos Neutrófilos Infectados</b>	57
5.	<b>DISCUSSÃO</b>	60
6.	<b>CONCLUSÃO</b>	69
	<b>REFERÊNCIAS</b>	70
	<b>ANEXOS</b>	80

**Artigo 1:** *Leishmania infantum* Lipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay.

**Artigo 2:** RIPK1-RIPK3-MLKL-Associated Necroptosis Drives *Leishmania infantum* Killing in Neutrophils.

**Artigo 3:** Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE

As Leishmanioses formam um grupo de doenças infecto-parasitárias, negligenciadas e de grande importância para a saúde pública. Os dados da Organização Mundial de Saúde indicam mais de 102 países endêmicos, com 12 milhões de casos da infecção e 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença (WHO, 2015).

As Leishmanioses apresentam-se sob diversas manifestações clínicas que são desenvolvidas após a infecção com parasitos do gênero *Leishmania*. A interação entre a espécie infectante e as respostas imunes do hospedeiro parece ser responsável pelo desenvolvimento e expressão fenotípica das formas clínicas: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV) (GEORGIADOU et al., 2015). As formas cutâneas (LC e LCM) são causadas pela infecção por *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* e a forma visceral (LV) pela infecção por *Leishmania donovani* ou *Leishmania infantum* (BRASIL, 2006; 2017). A LV é considerada a forma mais grave, pois pode levar a morte na ausência de tratamento adequado (BRASIL, 2017).

A LV é uma doença emergente com uma média de 400 mil casos por ano, distribuídos pela Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas (WHO, 2015). Na América do Sul, mais de 95% dos casos de LV reportados ocorreram no Brasil, concentrados na região Nordeste. Os casos registrados são mais frequentes no sexo masculino e em crianças menores de 5 anos (BRASIL, 2006, 2017).

Clinicamente, a LV é uma patologia generalizada e crônica, que afeta órgãos como a medula óssea, fígado e baço. Os sintomas incluem hepatoesplenomegalia, febre, perda de peso e manifestações hematológicas (CHAPPUIS et al., 2007). Entre as manifestações hematológicas mais comuns estão a anemia e a neutropenia (AL-GHAZALY et al., 2017). A anemia é decorrente do aumento da destruição periférica dos eritrócitos no baço e, às vezes, sangramento que conduz a um estado de inflamação persistente. A neutropenia (neutrófilos < 500/mm<sup>3</sup>) também é um agravante, pois favorece o estabelecimento e/ou aparecimento de infecções (BELIC et al., 2000; ABDELMOULA et al., 2003). As hemorragias e complicações infecciosas são os principais eventos que aumentam o risco de morte na

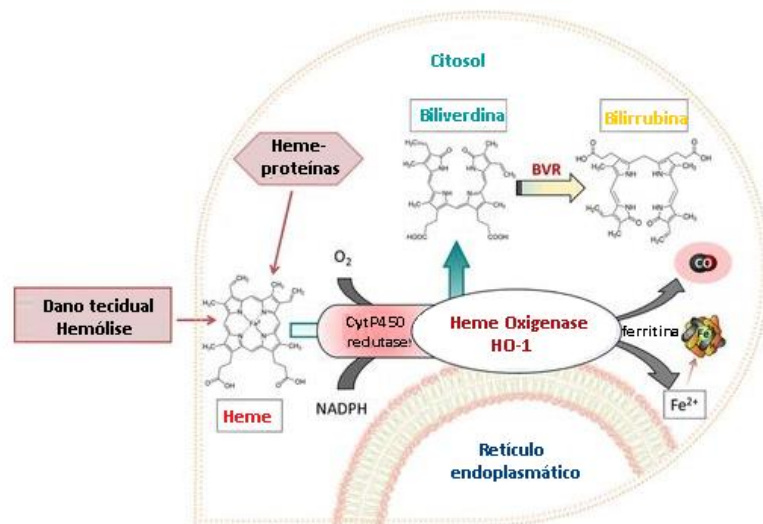
LV. Para redução dos casos letais os serviços de saúde devem detectar, diagnosticar e fornecer tratamento precoce para LV.

## 1.2 O GRUPAMENTO HEME

As manifestações hematológicas agravam o quadro de muitas doenças autoimunes e hereditárias (como anemia falciforme) por expor os tecidos a grandes quantidades de heme livre (LARSEN et al., 2012). O heme é uma molécula constituída por um anel de protoporfirina IX, contendo no seu centro um átomo de ferro no estado ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ). Em ambientes homeostáticos, a molécula do heme encontra-se inserida em heme-proteínas envolvidas, por exemplo, no transporte de oxigênio (hemoglobina), respiração celular (citocromos) e inativação (catalase) ou ativação do peróxido de hidrogênio (peroxidase) (GOZZELINO; SOARES, 2014).

Mesmo que indispensável para diversos processos biológicos, níveis elevados de heme livre (dissociado de proteínas) podem ser prejudiciais para o organismo por gerar estresse oxidativo, causando danos às membranas e organelas celulares. Esse estresse oxidativo pode ser amplificado pela reação de Fenton, onde o átomo de ferro contido no centro do heme, catalisa a geração de radicais hidroxilas ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) (GOZZELINO; JENEY; SOARES, 2010). Como uma consequência da sua citotoxicidade, o heme livre é um potente estímulo em deflagrar a resposta inflamatória (GRACA-SOUZA et al., 2002).

O principal mecanismo para impedir os efeitos nocivos do heme livre é o seu catabolismo intracelular pela enzima HO-1, que resulta em biliverdina,  $\text{Fe}^{+2}$  e monóxido de carbono ( $\text{CO}^2$ ) (OTTERBEIN; FORESTI; MOTTERLINI, 2016) (Figura 1).



**Figura 1. Representação da via heme/HO-1.** Fonte: Adaptado e modificado de OTTERBEIN; FORESTI; MOTTERLINI, 2016.

A resposta inflamatória induzida pelo heme desempenha um papel importante em diversas patologias como aterosclerose, vasculites, falha renal, reumatismo, rejeição de transplante e doenças autoimunes. Entretanto, os efeitos deletérios do heme são correlacionados a doenças com distúrbios hematológicos, como malária e anemia falciforme (DUTRA;BOZZA, 2014). Os pacientes com malária na fase aguda exibiram maiores níveis de heme associados à hemólise e indução da enzima HO-1 (CUNNINGTON et al., 2012; DEY et al., 2012). Essa correlação positiva heme/HO-1 afetou a diferenciação de células mielóides em neutrófilos, possivelmente, facilitando o aparecimento de outras infecções (CUNNINGTON et al., 2012).

Mecanismos associados ao dano celular, presença do heme livre e indução da enzima HO-1 podem estar envolvidos em episódios hemorrágicos na fase da LV que inclui anemia grave e, sobretudo, na interação entre células do sistema imune e o parasito.

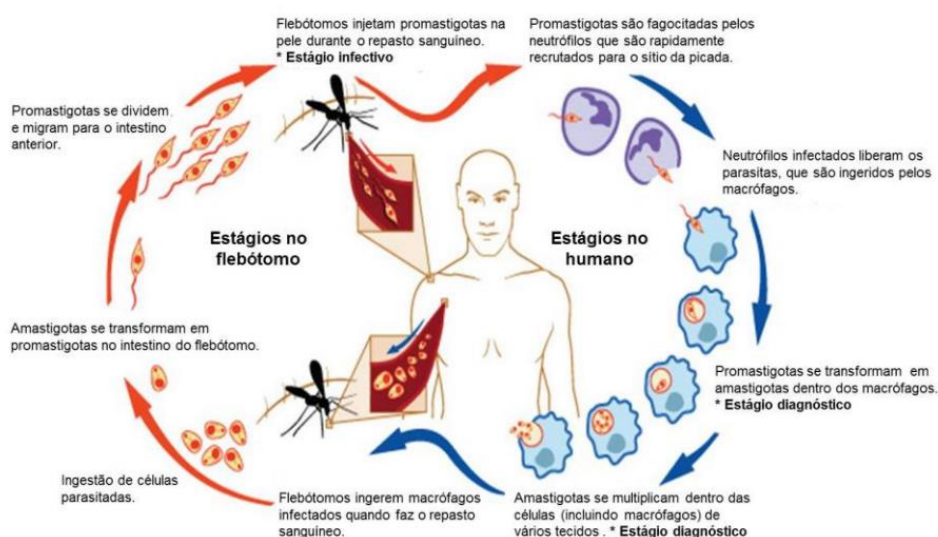
Sabe-se que na infecção de macrófagos por *Leishmania* a ativação da enzima HO-1 degrada o heme, impedindo a formação do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH) (PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005). Uma estratégia que beneficiou o parasito, assim como vimos na infecção de macrófagos por *L. infantum* (LUZ et al., 2012). Em dados publicados pelo nosso grupo, a ativação da enzima HO-1, favoreceu a replicação e a infecção por *L. infantum* em macrófagos humanos e murinos, com a redução de importantes agentes leishmanicidas nessas células. Ainda identificamos a HO-1 e o heme como importantes biomarcadores associados a LV, visto que no soro de pacientes com LV há maiores níveis de HO-1 (LUZ et al., 2012) e de heme total (FARIAS LUZ et al., 2016) quando comparados ao soro de indivíduos assintomáticos. Entretanto,

são escassos os trabalhos que mostram o envolvimento do heme na modulação de outras células do sistema imune inato durante a infecção por *Leishmania* sp.

### 1.3 CICLO DE VIDA DA *LEISHMANIA*

A *Leishmania* é o agente etiológico da Leishmaniose e pode ser encontrado na forma promastigota (flagelada) no trato digestivo do hospedeiro invertebrado (vetores flebotomíneos) e na forma amastigota nos hospedeiros vertebrados (WHO, 2008).

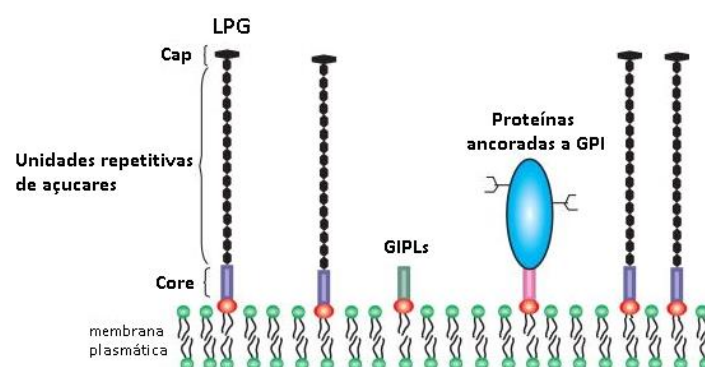
A transmissão da *Leishmania* para o hospedeiro vertebrado ocorre durante a alimentação sanguínea das fêmeas de flebotomíneos infectadas (Figura 2). Durante a sua alimentação, o flebótomo fêmea injeta a saliva formando um lago sanguíneo (PRATES et al., 2012). Em seguida, as formas promastigotas da *Leishmania* são regurgitadas pelo vetor e entram em contato com o hospedeiro, desencadeando o recrutamento de neutrófilos para o local da picada (VAN ZANDBERGEN et al., 2004; PETERS; SACKS, 2009). Essas formas flageladas são fagocitadas por neutrófilos e posteriormente, por macrófagos onde se replicam e transformam-se em formas amastigotas (PETERS; SACKS, 2009; CHAPPUIS et al., 2007; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Estes eventos iniciais são críticos para estabelecimento e sucesso da infecção.



**Figura 2. Ciclo biológico da *Leishmania* sp.** Fonte: Adaptado de [www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx](http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx)

#### 1.4 O LIPOFOSFOGLICANO DA *LEISHMANIA*

Parasitas da família Trypanosomatidae são caracterizados pela presença de um glicocálix abundante em sua superfície. Estudos têm mostrado que há mudanças na composição do glicocálix da *Leishmania*, que garantem a adaptação e sobrevivência desses parasitos dentro de ambos hospedeiros, inseto e mamífero (CUNNINGHAM, 2002). A *Leishmania* na sua forma promastigota tem no seu glicocálix a predominância do lipofosfoglicano (LPG), além da presença de glicoinositolfosfolípidios (GIPLs) e proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 3). Em contraste, formas amastigotas apresentam uma redução das moléculas presentes no glicocálix de promastigotas e parecem ser revestidas por uma camada de glicolipídios e glicosfingolipídios derivados da célula hospedeira (NADERER;VINCE; MCCONVILLE, 2004).



**Figura 3. Esquema representativo do glicocálix das formas promastigotas de *Leishmania*.** Fonte: Adaptado e modificado de Essentials of Glycobiology, CUMMINGS et al., 2009.

Dentre as moléculas presentes na superfície das formas promastigotas de *Leishmania*, destaca-se o LPG. O LPG é uma molécula formada por quatro domínios representados na Figura 4: uma âncora lipídica 1-O-alkil-2-liso-fosfatidilinositol, um núcleo de heptassacarídeos (“core”), unidades repetitivas de dissacarídeo-fosfato Gal( $\beta$ 1,4)Man( $\alpha$ 1)-PO<sub>4</sub> e um pequeno oligossacarídeo neutro constituindo uma estrutura do tipo “cap” (IBRAIM et al., 2013). As análises estruturais do LPG sugerem uma conservação da âncora lipídica e do “core” entre as diversas espécies de *Leishmania*. Entretanto, há diferenças na composição e número de açúcares das unidades repetitivas e na presença do “cap”. Essas diferenças são importantes para determinar a especificidade do vetor flebotomíneo ao parasito (SOARES et al., 2010).

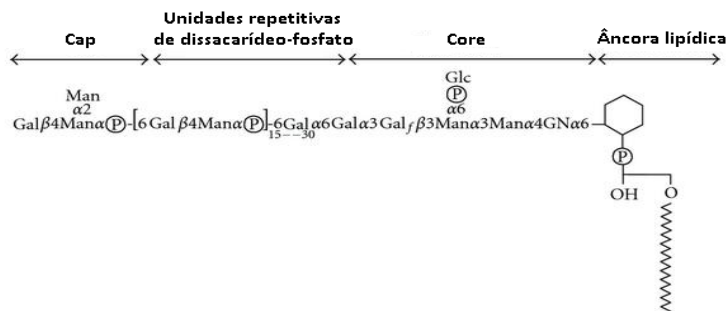


Figura 4. Estrutura do Lipofosfoglicano (LPG) da *Leishmania*. Fonte: Adaptado de ZAMBONI et al., 2011.

As diferenças estruturais do LPG, descritas anteriormente, também podem existir entre cepas de uma mesma espécie, a exemplo das cepas de *L. infantum*, onde as unidades repetitivas de açúcares apresentam ou não ramificações laterais glicídicas. A depender do número de glicídios como ramificações laterais, o LPG de *L. infantum* pode ser classificado em três tipos: tipo I, não apresenta ramificações laterais glicídicas; tipo II, apresenta adição de um glicídio como ramificações laterais e tipo III, apresenta adição de dois a três glicídios como ramificações laterais (SOARES et al., 2010; COELHO-FINAMORE et al., 2011) (Figura 5).

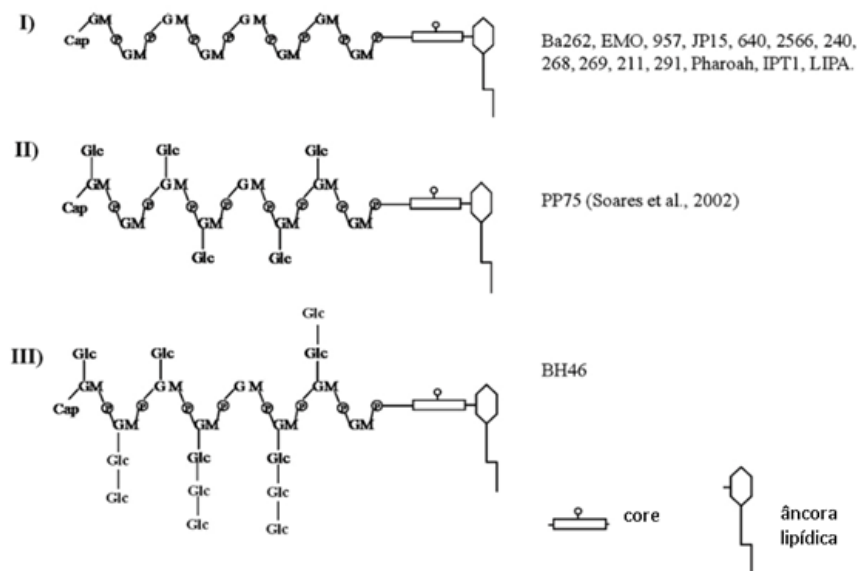


Figura 5. Tipos de LPG em diferentes cepas da espécie *L. infantum*. Fonte: Adaptado e modificado de COELHO-FINAMORE et al., 2011.

O LPG é considerado um fator de virulência multifuncional na interação parasito-hospedeiro. Nas formas promastigotas, quando presentes no interior do flebótomo, a molécula do LPG desempenha um papel protetor em relação a enzimas do intestino do inseto vetor e também tem papel na sua diferenciação para formas metacíclicas infectantes. Quando essas formas flageladas se encontram no mamífero, no início da infecção, o LPG pode inibir a resposta inflamatória e induzir a produção de mediadores anti-inflamatórios, permitindo a *Leishmania* resistir ao sistema imune do hospedeiro (PRIVE; DESCOTEAUX, 2000; HOLM et al., 2001; LUZ et al., 2012; LIMA et al., 2017).

Os trabalhos recentes do nosso grupo mostram que o isolado de LPG de *L. infantum* é reconhecido em macrófagos pelos receptores do tipo *toll* (TLR-1/2) acionando a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPs quinases), com produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), óxido nítrico e proteína quimioatrativa de monócito (MCP-1) (LIMA et al., 2017). Em colaboração com Albert Descoteaux, nós também produzimos cepas de *L. infantum* deficientes na produção de LPG ( $\Delta lpg1$ ). Apesar de não haver diferença morfológica entre as formas  $\Delta lpg1$  e as formas selvagens (WT), o crescimento das *Leishmanias*  $\Delta lpg1$  foi mais lento, embora ambas atingissem a fase estacionária. Além disso, durante a infecção de macrófagos, os promastigotas  $\Delta lpg1$  tiveram sua viabilidade reduzida, associada à ativação da resposta pró-inflamatória, o que não foi observado na infecção com *L. infantum* WT (LAZARO-SOUZA et al., 2018).

Muitos trabalhos exploram o papel do LPG em macrófagos por ser a célula onde a *Leishmania* se diferencia de promastigota em amastigota. Entretanto, o LPG presente na superfície das formas promastigotas inicia a interação do parasito com o hospedeiro, no momento de inoculação da *Leishmania* pelo vetor flebotomíneo. A partir disso, como os neutrófilos são rapidamente recrutados para o local da picada (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; RIBEIRO-GOMES et al., 2012) são os primeiros a responder a presença do LPG, o que torna relevante o estudo da relação neutrófilo-LPG-parasito.



## 1.5 NEUTRÓFILOS, A PRIMEIRA LINHA DE DEFESA

Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, sendo as primeiras células a serem recrutadas (KOLACZKOWSKA;KUBES, 2013). Dados experimentais e clínicos mostram que, após a infecção, a localização de neutrófilos no sítio inflamatório é fundamental para remoção do agente infectante. Em quadros patológicos, a neutropenia acentuada no sangue leva à imunodeficiência grave em humanos (WELTE; ZEIDLER, 2009), favorecendo o surgimento de diversas doenças.

Os neutrófilos podem ser chamados de leucócitos polimorfonucleares (PMN) por apresentarem um núcleo multilobado, além disso, são caracterizados pela presença de grânulos citoplasmáticos e marcadores de superfície específicos. O tempo de vida dos neutrófilos é em média de 8-12h na circulação e de 1-2 dias nos tecidos, sendo programados constitutivamente para uma morte celular por apoptose. Esses neutrófilos apoptóticos são fagocitados por macrófagos, mantendo a homeostase do sistema imune (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014). A apoptose é também uma forma de eliminar os neutrófilos danificados em processos patológicos, promovendo a resolução da inflamação (RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009).

Como os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da infecção, sua capacidade de fagocitar e eliminar o patógeno são essenciais para a defesa do organismo (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). A resposta antimicrobiana dos neutrófilos consiste em migração para o sítio de infecção, reconhecimento e fagocitose com subsequente eliminação do microrganismo pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e componentes citotóxicos dos grânulos (BORREGAARD, 2010). Os neutrófilos altamente ativados podem ainda conter microrganismos no meio externo ao liberar armadilhas extracelulares, denominadas de "*Neutrophils Extracellular Traps– NET*" (BRINKMANN et al., 2004).

Para chegar ao sítio de infecção, os neutrófilos realizam o processo conhecido como transmigração, que consiste na saída da circulação ao atravessar a parede do endotélio. Esse processo tem início com a interação entre selectinas do endotélio e dos neutrófilos. A selectina CD62-L é expressa de maneira constitutiva na superfície dos neutrófilos e a diminuição desta selectina promove o rolamento dos neutrófilos no endotélio. Em seguida, a expressão de  $\beta$ -integrinas na superfície dos neutrófilos, como

CD11b/CD18, permite uma forte adesão e também auxilia na transmigração. Para facilitar o caminho a ser percorrido pelos neutrófilos nesse processo, há liberação de moléculas quimioatrativas, a exemplo da interleucina-8 (IL-8) (KOBAYASHI, 2008). Ao completar a passagem pela parede do endotélio, os neutrófilos fagocitam o patógeno e têm seus sistemas microbicidas ativados dentro do vacúolo fagocítico ou no exterior da célula.

O vacúolo fagocítico é formado pelo englobamento de microrganismos para o meio intracelular. A fagocitose de microrganismos ativa a formação do complexo NADPH na membrana do fagossomo, gerando a produção do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) que tem um efeito cascata na geração de outras ROS, potenciais agentes microbicidas (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2013).

Além das respostas oxidativas, os neutrófilos podem controlar infecções patogênicas com o extravasamento do conteúdo dos grânulos no fagossomo ou no meio extracelular. Os grânulos dos neutrófilos contêm proteínas necessárias para mediar o recrutamento, a quimiotaxia e atividade antimicrobiana. Eles são classificados em três tipos, a depender da sua ordem de formação na maturação dos neutrófilos: grânulos primários (azurofílicos), grânulos secundários (específicos) e grânulos terciários (gelatinases) (PHAM, 2006).

Os primeiros grânulos a serem formados são os primários (azurofílicos) e contêm peptídeos comumente liberados no interior do fagossomo com atividade antimicrobiana oxidativa e não oxidativa. Estes peptídeos incluem a MPO,  $\alpha$ -defensinas e serino-proteases. A MPO é fundamental para morte oxidativa ao reagir com o peróxido de hidrogênio para formar ROS e nitrogênio (DALE;BOXER; LILES, 2008). As serino-proteases, como a catepsina-G e a elastase neutrofílica (NE), além da atividade microbicida, auxiliam no processo de adesão celular e transmigração. Em sequência na ordem de maturação são formados os grânulos secundários (específicos). Estes grânulos também possuem moléculas com atividade microbicida, como lactoferrina e lisozimas, além da collagenase metaloproteinase 8 (MMP-8)(SEGAL, 2005) . Os grânulos terciários (gelatinases) são os últimos a serem formados e têm uma forte tendência à exocitose, contêm receptores de membrana e enzimas que degradam a matriz extracelular, como a metaloproteinase-9 (MMP-9) (BORREGAARD, 2010).

## 1.6 INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E *LEISHMANIA*

Os neutrófilos migram rapidamente para o local de inoculação da *Leishmania*, onde podem ter efeito direto na morte do parasito e na resposta imune protetora. Essas respostas podem ser coordenadas pela via de sinalização do TLR-2 com a indução de mediadores quimiotáticos e de mecanismos leishmanicidas (TAVARES et al., 2014; SACRAMENTO et al., 2017).

Vários grupos mostraram que a depleção de neutrófilos em camundongos favoreceu a infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, como por *Leishmania major* (LIMA et al., 1998), *L. donovani* (MCFARLANE et al., 2008) e *L. braziliensis* (NOVAIS et al., 2009). Ainda foi visto que os neutrófilos são capazes de fagocitar e destruir promastigotas de *L. infantum* no baço de camundongos BALB/c, contribuindo para o controle do crescimento parasitário (ROUSSEAU et al., 2001). Entretanto, a morte de *L. amazonensis* em neutrófilos parece ser dependente do estágio do parasito como promastigota, mas não amastigota. Dados *in vitro* de Tavares e colaboradores mostraram que neutrófilos humanos infectados por promastigotas de *L. amazonensis* são ativados pela produção de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), conduzindo a degranulação e produção de ROS que foram efetivos na morte do parasito (TAVARES et al., 2014).

As NETs formam outra estratégia que pode diminuir a carga parasitária no início da infecção. Após a interação de neutrófilos humanos com *L. amazonensis* houve a liberação de NETs pelos neutrófilos, com efeito tóxico para o parasito (GUIMARAES-COSTA et al., 2009). Trabalhos mais recentes evidenciaram que esse mecanismo microbicida mostrou-se dependente da geração de ROS e da NE (GABRIEL et al., 2010; ROCHAEL et al., 2015). Na infecção de neutrófilos por *L. donovani*, as NETs não tiveram atividade leishmanicida, resistência observada somente na presença do LPG na superfície da *L. donovani*. Neste caso, as NETs ajudariam só na contenção das formas promastigotas, facilitando a remoção por macrófagos (GABRIEL et al., 2010).

Apesar do arsenal microbicida dos neutrófilos, a *Leishmania* pode conseguir se manter viável no interior desta célula, utilizando-a como um veículo transitório para atingir outras células e/ou órgãos. Para isso, o parasito pode inibir a resposta oxidativa (LAUFS et al., 2002; SALEI et al., 2017) ou impedir a fusão de lisossomos a vacúolos fagocíticos (GUEIRARD et al., 2008).

Neutrófilos contendo *Leishmania* podem sofrer apoptose e serem ingeridos por macrófagos, que assim serão infectados pelo parasito. Essa hipótese é conhecida como “Cavalo de Tróia”, pois permite uma entrada silenciosa da *Leishmania* sem ativação do macrófago (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). Durante um estudo do nosso grupo, a saliva do inseto vetor da *L. infantum* induziu apoptose em neutrófilos proporcionando um nicho intracelular favorável à replicação do parasito devido a produção de PGE<sub>2</sub> e inibição de ROS (PRATES et al., 2012). Esses resultados foram reforçados com a publicação recente do Laskay e colaboradores, onde em neutrófilos apoptóticos infectados por *L. major* há diminuição da produção de ROS e assim maior sobrevivência do parasito (SALEI et al., 2017).

Embora os neutrófilos sejam os primeiros respondentes durante a infecção, é importante ressaltar que essas células também estão presentes em condições inflamatórias e infecciosas crônicas (CARLSEN et al., 2015). Em dados recentes, neutrófilos foram encontrados nas lesões tardias de animais infectados com *Leishmania*, naturalmente ou experimentalmente (VERCOSA et al., 2012). Os neutrófilos ainda foram identificados nas lesões crônicas de pacientes com leishmaniose cutânea, podendo ter um papel na eliminação de formas amastigotas (BOAVENTURA et al., 2010; DABOUL, 2010).

Em se tratando de infecções por *L. donovani* ou *L. infantum* nos estudos de LV, a depender do estágio clínico da doença, os neutrófilos podem apresentar diferenças no status de ativação. A interação inicial dos neutrófilos com moléculas presentes na superfície do parasito ou com fatores hematológicos ao longo da LV tem interferido no estabelecimento da infecção. Entretanto os mecanismos associados à relação neutrófilo-*Leishmania*-resposta do hospedeiro ainda são pouco explorados.

## 2. JUSTIFICATIVA

Na LV humana as manifestações hematológicas são comuns. O dano celular extenso com a degradação de heme-proteínas poderia levar a liberação do heme associado a um quadro inflamatório característico da doença (AL-GHAZALY et al., 2017). Dados do nosso grupo evidenciaram níveis mais elevados de HO-1 (LUZ et al., 2012) e de heme (FARIAS LUZ et al., 2016) no soro de pacientes com LV do que no soro de indivíduos assintomáticos. O heme sendo uma molécula pró-inflamatória é capaz de induzir a migração de neutrófilos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (GRACA-SOUZA, 2002). Além da migração, o heme ativa nessas células a produção de ROS e foi proposto que ambas atividades são mediadas por um receptor acoplado à proteína Gai (PORTO et al., 2007). Os neutrófilos são leucócitos importantes nos tempos iniciais da infecção por *Leishmania* (PRATES et al., 2012) e a redução no número de neutrófilos favorece o aparecimento de co-infecções em pacientes graves (VOLTARELLI et al., 1990). Decorrente do explanado anteriormente, as alterações sanguíneas presentes na LV podem conduzir a uma relação entre heme e neutrófilos capaz de manter a inflamação (LARSEN et al., 2012). Porém, essa perspectiva da doença ainda não foi explorada. Além disso, investigar a resposta neutrofílica frente à *Leishmania* nos momentos iniciais é fundamental para compreender como a infecção se estabelece. Nesse contexto, deve-se atentar que componentes da superfície do parasito podem modular a resposta de ativação de neutrófilos, como no caso do LPG, por ser a molécula presente nas formas promastigotas infectantes, implicada em mecanismos de escape do parasito, tais como metaciclogênese e impedimento de fusão de vacúolos ácidos (PRIV; DESCOTEAUX, 2000). Dividimos assim este trabalho em duas partes: parte I, investigação dos mecanismos de ativação de neutrófilos infectados em presença de heme e parte II, avaliação do papel do LPG na superfície da *L. infantum* na interação com neutrófilos.

### 3. PARTE I

#### 3.1 HIPÓTESE

A presença do heme durante a infecção de neutrófilos humanos com *L. infantum*, altera o balanço oxidativo à favor do parasito.

#### 3.2 OBJETIVOS

##### 3.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação entre heme e neutrófilos humanos durante a infecção por *Leishmania infantum*.

##### 3.2.2 Objetivos Específicos

- Correlacionar os níveis séricos de heme total com LDH, HO-1 ou a contagem de neutrófilos periféricos em pacientes com LV;
- Analisar o envolvimento do heme na sobrevivência de neutrófilos durante a infecção por *L. infantum*;
- Observar se o heme intervém na resposta inflamatória de neutrófilos infectados por *L. infantum*;
- Avaliar o papel do heme na carga parasitária de neutrófilos infectados por *L. infantum*;
- Comparar o efeito do heme ao do  $Fe^{+2}$  durante a infecção de neutrófilos por *L. infantum*;
- Investigar o papel do heme e do  $Fe^{+2}$  em mecanismos oxidativos na infecção de neutrófilos por *L. infantum*.

### 3.3 MANUSCRITO I

#### **HEME DRIVES OXIDATIVE STRESS-ASSOCIATED CELL DEATH IN HUMAN NEUTROPHILS INFECTED WITH *Leishmania infantum*.**

O trabalho analisa como a presença do heme altera o status de ativação de neutrófilos humanos infectados com *L. infantum* e como isso influencia no desfecho da infecção.

Resumo:

Em pacientes com LV de uma área endêmica no Brasil, observamos uma correlação positiva entre os níveis séricos de heme e de HO-1 ou LDH e uma associação destes eventos com neutropenia. Posteriormente, usando um modelo de infecção de neutrófilos humanos *in vitro*, notamos que a presença de heme diminui a viabilidade de células hospedeiras com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas neutrofílicas, enquanto aumenta a sobrevivência de *Leishmania* intracelular. Quando as culturas de células foram incubadas com  $Fe^{+2}$ , componente presente na estrutura da molécula heme, o crescimento do parasito foi aumentado, enquanto a ativação dos neutrófilos não foi afetada. Além disso, os neutrófilos infectados em presença de heme desencadearam aumento na transcrição da heme oxigenase-1 (HO-1), bem como na atividade enzimática da superóxido dismutase-1 (SOD-1), que pode afetar as respostas oxidativas nessas células. A interferência em vias oxidativas reduziu a taxa de proliferação da *L. infantum* nos neutrófilos infectados. Em conjunto, esses dados indicam que o heme promove a sobrevivência da *L. infantum* através da subversão da função neutrofílica e do estado oxidativo. Este estudo estimula novas interpretações para a relação imuno-patogênica envolvendo neutrófilos e suas implicações no equilíbrio inflamatório associado à LV.

Esse artigo foi publicado no periódico internacional *Frontiers in Immunology* (Fator de Impacto= 5.5).



# Heme Drives Oxidative Stress-Associated Cell Death in Human Neutrophils Infected with *Leishmania infantum*

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Rudolf Lucas,  
Medical College of Georgia,  
Augusta University, United States

### Reviewed by:

IRENE GARCIA,  
Université de Genève,  
Switzerland  
Abdul Qader Abbady,  
AECS, Syria

### \*Correspondence:

Bruno B. Andrade  
bruno.andrade@bahia.fiocruz.br;  
Valeria M. Borges  
vborges@bahia.fiocruz.br

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

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

### Specialty section:

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

Received: 24 August 2017

Accepted: 08 November 2017

Published: 23 November 2017

### Citation:

Quintela-Carvalho G, Luz NF,  
Celes FS, Zanette DL, Andrade D,  
Menezes D, Tavares NM,  
Brodskyn CI, Prates DB,  
Gonçalves MS, de Oliveira CI,  
Almeida RP, Bozza MT, Andrade BB  
and Borges VM (2017) Heme Drives  
Oxidative Stress-Associated  
Cell Death in Human Neutrophils  
Infected with *Leishmania infantum*.  
Front. Immunol. 8:1620.  
doi: 10.3389/fimmu.2017.01620

Graziele Quintela-Carvalho<sup>1,2,3†</sup>, Nívea F. Luz<sup>1†</sup>, Fabiana S. Celes<sup>1,2</sup>, Dalila L. Zanette<sup>1</sup>, Daniela Andrade<sup>1</sup>, Diego Menezes<sup>4</sup>, Natália M. Tavares<sup>1,2</sup>, Claudia I. Brodskyn<sup>1,2</sup>, Deboraci B. Prates<sup>5</sup>, Marilda S. Gonçalves<sup>1,2</sup>, Camila I. de Oliveira<sup>1,2</sup>, Roque P. Almeida<sup>6</sup>, Marcelo T. Bozza<sup>7</sup>, Bruno B. Andrade<sup>1,8,9,10\*‡</sup> and Valeria M. Borges<sup>1,2\*‡</sup>

<sup>1</sup>Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Brazil, <sup>2</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil, <sup>3</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano (IFBaiano), Santa Inês, Brazil, <sup>4</sup>Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Aracaju, Brazil, <sup>5</sup>Departamento de Biomorfologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil, <sup>6</sup>Departamento de Medicina, Hospital Universitário, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju, Brazil, <sup>7</sup>Departamento de Imunologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil, <sup>8</sup>Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research (MONSTER) Initiative, Salvador, Brazil, <sup>9</sup>Universidade Salvador (UNIFACS), Laureate Universities, Salvador, Brazil, <sup>10</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil

Free heme is an inflammatory molecule capable of inducing migration and activation of neutrophils. Here, we examine the heme-driven oxidative stress-associated cell death mechanisms in human neutrophils infected with *Leishmania infantum*, an etiologic agent of visceral leishmaniasis (VL). We first performed exploratory analyses in a population of well characterized treatment-naïve VL patients as well as uninfected controls, who were part of previously reported studies. We noted a positive correlation between serum concentrations of heme with heme oxygenase-1 (HO-1) and lactate dehydrogenase, as well as, a negative correlation between heme values and peripheral blood neutrophils counts. Moreover, *in vitro* infection with *L. infantum* in the presence of heme enhanced parasite burden in neutrophils, while increasing the production of reactive oxygen species and release of neutrophilic enzymes. Additional experiments demonstrated that treatment of infected neutrophils with ferrous iron (Fe<sup>+2</sup>), a key component of the heme molecule, resulted in increased parasite survival without affecting neutrophil activation status. Furthermore, stimulation of infected neutrophils with heme triggered substantial increases in HO-1 mRNA expression as well as in superoxide dismutase-1 enzymatic activity. Heme, but not Fe<sup>+2</sup>, induced oxidative stress-associated cell death. These findings indicate that heme promotes intracellular *L. infantum* survival via activation of neutrophil function and oxidative stress. This study opens new perspectives for the understanding of immunopathogenic mechanisms involving neutrophils in VL.

**Keywords:** *Leishmania infantum*, heme, iron, neutrophils, cell death, heme oxygenase 1



## INTRODUCTION

Leishmaniasis is an emerging tropical neglected disease and causes an average of 2 million new cases per year (1). The disease is caused by parasites of the genus *Leishmania* and can be associated with different clinical manifestations, such as visceral leishmaniasis (VL), which is lethal if not treated. Hematological manifestations are common in VL, mainly anemia and neutropenia. Anemia is associated with a persistent inflammatory condition, increased peripheral destruction of erythrocytes in the spleen, sometimes predisposing to bleeding (2, 3). These hematological disorders can lead to the degradation of hemoglobin and consequent release of heme.

Heme is a molecule composed of a central iron atom bonded to four porphyrin groups (iron protoporphyrin IX), and it is of vital importance to many biological processes associated with proteins involved in redox activity, such as hemoglobin, cytochrome c, catalases, and peroxidases. Under pathophysiological conditions, heme can be released in excessive amounts by heme proteins as well as during cell death (4). In this context, free heme, being quite hydrophobic, merges in cell membranes and increases cell susceptibility to oxidative stress and generation of reactive oxygen species (ROS) (5). In addition, free heme is also able to induce recruitment, activation, and affect death of leukocytes, especially neutrophils (6–9). Antioxidant mechanisms as well as action of scavenger proteins such as hemopexin and albumin help to prevent or minimize the inflammatory effects of heme (10). A stress-responsive enzyme, heme oxygenase-1 (HO-1), catabolizes heme, releasing biliverdin, carbon monoxide, and iron (5). HO-1 has been implicated in the pathogenesis of several infectious diseases, including leishmaniasis. During *Leishmania* infection, the activation of HO-1 results in heme degradation, avoiding the formation of NADPH-oxidase complex (an enzyme containing grouping heme) and ROS production in the parasitophorous vacuole (11). We have previously demonstrated that induction of HO-1 favors *Leishmania infantum* replication and infection in human and murine macrophages by reduction of its leishmanicidal mechanisms, as nitric oxide and ROS (12). We have also described increased serum levels of HO-1 and total heme in VL patients compared to healthy endemic controls (12, 13).

Neutrophils are essential cells from the innate immune system, are rapidly recruited to inflammatory sites and have been described to play a critical role in *Leishmania* infection (14, 15). Recruitment and stimulation of neutrophils in response to inflammatory stimulus lead to differential expression of activation surface markers and increased degranulation of several enzymes, cytokines, and chemokines, while also induces production of free radicals and antioxidants enzymes, such as superoxide dismutases (SOD) (16). The release of granule proteases is important for neutrophil migration and is partially responsible for their microbicidal activity, as well metalloproteinase 9 (MMP-9), neutrophil elastase (NE), and myeloperoxidase (MPO) (17, 18). Our group has previously demonstrated that neutrophils participate on *Leishmania* killing through the activation and release of TNF- $\alpha$ , NE, and MPO (19–23). Whether these activities are directly associated with differential

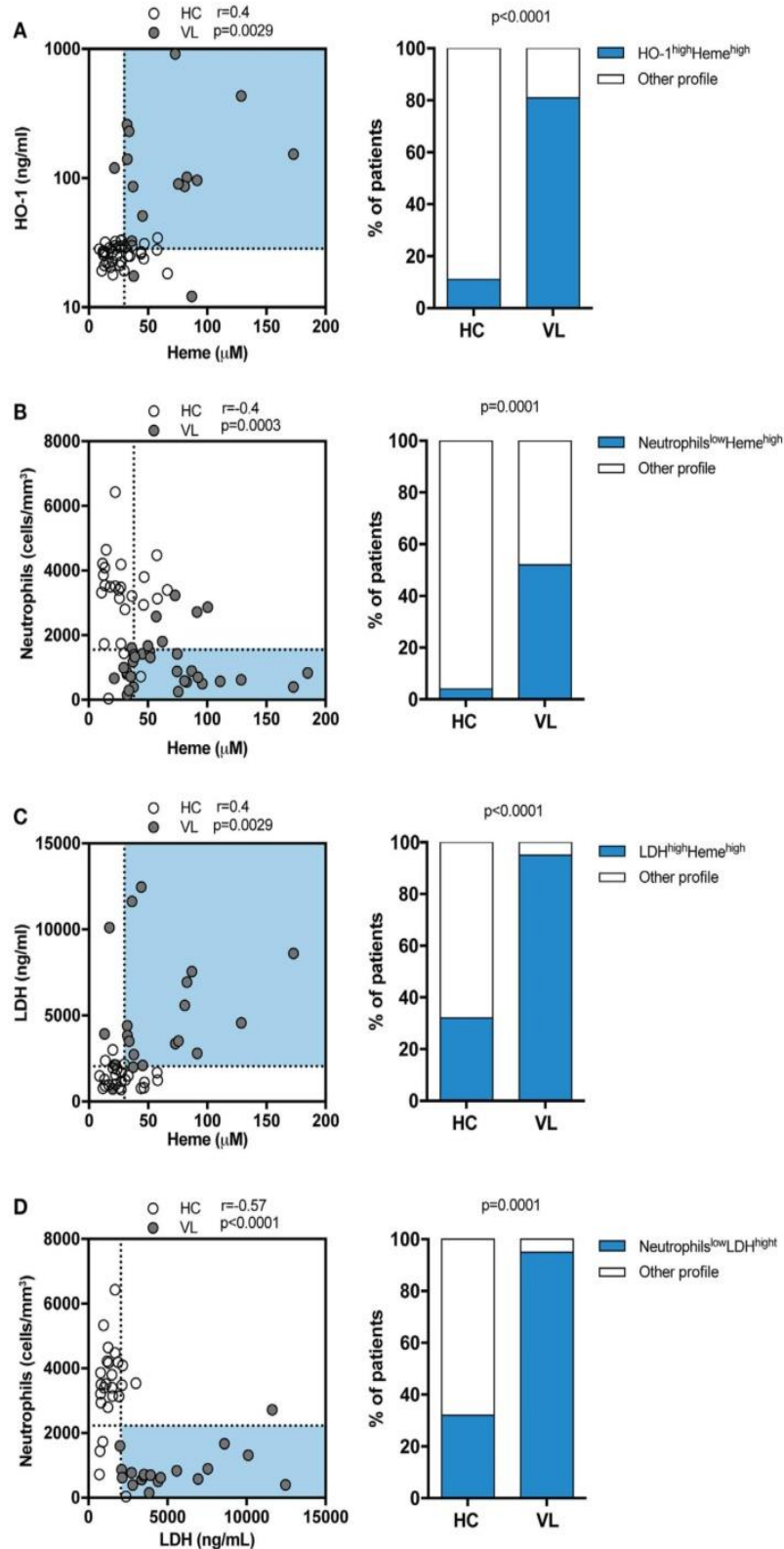
cell death pathways in *Leishmania*-infected neutrophils are not fully understood.

In the present study, we evaluated the effect of heme on human neutrophils during infection with *L. infantum*. Our results revealed in patients with active VL a positive correlation between serum concentrations of heme and HO-1 or lactate dehydrogenase (LDH, an inflammation-derived tissue damage marker), as well as, a negative correlation between heme values and peripheral blood neutrophils counts. We also observed that *in vitro* infection with *L. infantum* in presence of heme enhances neutrophil activation and promotes parasite survival. These findings indicate that heme promotes intracellular *L. infantum* survival via activation of neutrophil function and oxidative stress, in addition to induction of cell death. Increased neutrophil cell death and oxidative consequences could be the basis for the occurrence of neutropenia, which hallmarks VL.

## RESULTS

### Circulating Levels of Heme Are Positively Correlated with Serum HO-1 and LDH Values and Associated with Neutropenia in Human VL

Both HO-1 and heme have been previously described as important biomarkers associated to VL (12, 13). Serum LDH is usually elevated in hemolytic diseases, reflecting the degree of cell/tissue damage (24). In the present study, we re-examined the data from a patient cohort previously published by our group (12, 13) to assess correlations between circulating levels of total heme with LDH, HO-1, or peripheral blood neutrophils counts. Serum samples were obtained from patients with VL and from sex-matched endemic controls, all from a highly endemic area in the northeast of Brazil. In this study population, heme levels were shown to be positively correlated with HO-1 ( $r = 0.4$ ;  $p = 0.0029$ ; **Figure 1A**) and about 81% of VL patients exhibited simultaneously high levels of total heme and of HO-1, a condition observed in only 11% of healthy individuals ( $r = 0.04$ ;  $p = 0.0029$ ; **Figure 1A**). In addition, there was a negative correlation between levels of heme and peripheral blood neutrophil counts ( $r = -0.4$ ;  $p = 0.0003$ ; **Figure 1B**); with 52% of VL patients exhibiting simultaneously high levels of heme and low neutrophil counts, which was observed in only 4% of healthy individuals. Heme levels were shown to be positively correlated with LDH values ( $r = 0.4$ ;  $p = 0.0029$ ; **Figure 1C**) and approximately 90% of VL patients exhibited simultaneously high levels of LDH and of heme, a condition observed in only 30% of healthy individuals. Furthermore, we observed a negative correlation between levels of LDH and of peripheral blood neutrophil counts ( $r = -0.57$ ;  $p < 0.0001$ ; **Figure 1D**). Up to 92% of VL patients exhibited simultaneously high levels of LDH and low neutrophil counts, which was observed in a minority of healthy individuals (30%). These observations argued that heme levels in serum may be directly linked to neutrophil death in the peripheral blood.



**FIGURE 1** | Circulating levels of total heme positively correlate with heme oxygenase-1 (HO-1) and lactate dehydrogenase (LDH) concentrations and associate with neutropenia in patients with visceral leishmaniasis (VL). Serum levels of total heme were tested for correlation with HO-1 (A), peripheral neutrophil counts (B) and LDH levels (C) using the Spearman test. The dotted lines represent median values of the parameters listed in the X or Y-axis, respectively. Frequencies of healthy endemic controls (HC) individuals and those with VL who simultaneously displayed high levels of total heme and HO-1 (A) or high levels of total heme and low neutrophil counts (B) or high levels of total heme and high levels of LDH (C) were compared using the Fisher's exact test. Plasma levels of LDH were correlated to the peripheral neutrophil counts (D) using the Spearman test. Frequencies of healthy endemic controls (HC) individuals and those with VL who simultaneously displayed high levels of LDH and low neutrophil counts (D) were compared using the Fisher's exact test. In the left graphs, each dot represents a single individual.



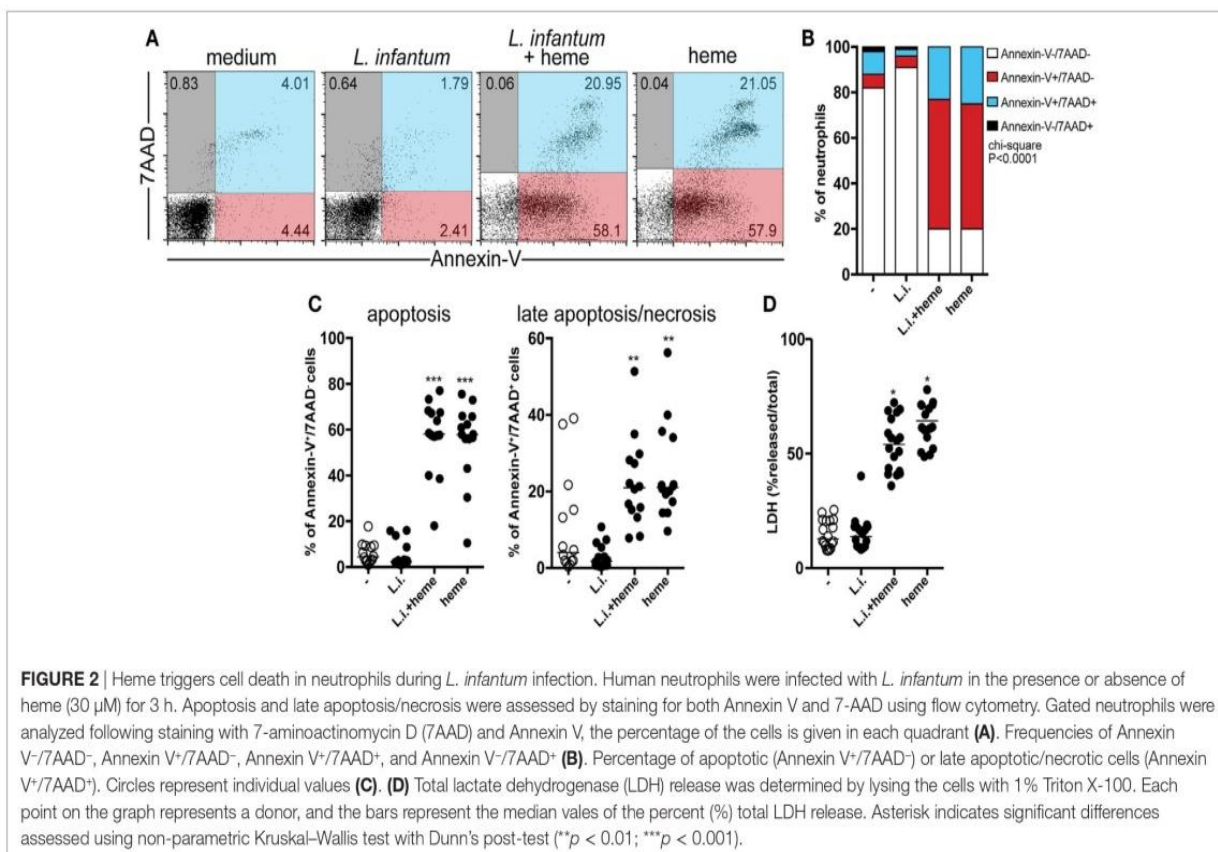
### Heme Triggers Cell Death in Neutrophils during *L. infantum* Infection

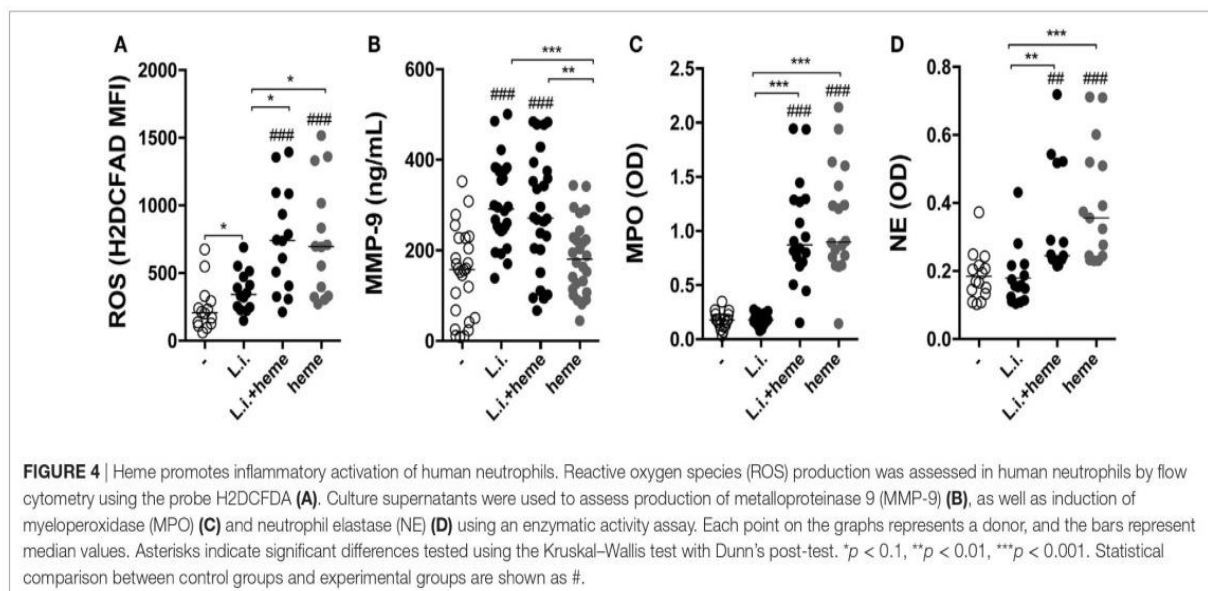
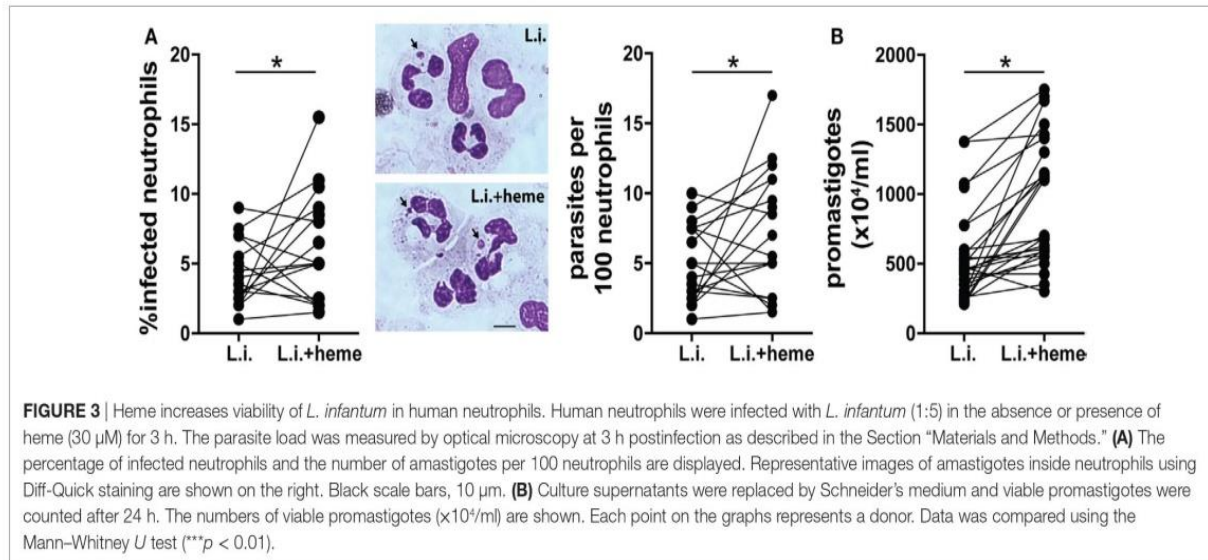
Given that we found that heme is related to reduced neutrophil count in patients with VL, we next focused on investigating whether heme is involved in neutrophil death in the context of *L. infantum* infection using an *in vitro* model employing flow cytometry. Using this approach, cells with the staining profile of Annexin-V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup> are considered apoptotic whereas those which are Annexin-V<sup>+</sup>/7AAD<sup>+</sup> are considered in late apoptosis/necrosis. Human neutrophils were experimentally infected with *L. infantum* and incubated in the absence or presence of heme for 3 h. We have used 30 μM of heme in the experiments because this was the average level detected in serum from patients with VL (13), as similar to what has been described in malaria (25, 26) and sickle cell disease (27). In addition, doses close to 30 μM have been commonly used in *in vitro* experiments published from other groups (8, 9, 28). We observed that *L. infantum* infection was not able to significantly induce neutrophil apoptosis, neither necrosis (Figures 2A,C), however in the presence of heme, a higher frequency of the neutrophils became Annexin-V<sup>+</sup>/7AAD<sup>+</sup> (e.g., in late apoptosis/necrosis) (Figures 2B,C). Noteworthy, our experiments show important donor variability in heme-induced cell death, ranging from 20% (min value) to 80% (max value), and the average% of early apoptosis (Annexin-V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup> cells) was 60%, while the median frequency late apoptotic/necrotic cells (Annexin-V<sup>+</sup>/7AAD<sup>+</sup> cells) was around 20% (Figure 2C). Following *L. infantum* infection in the presence of heme, there

was significant increase in LDH levels released in cell supernatants, indicating augmented cell death (Figure 2D). These findings indicate that heme is tightly associated with increased cell death in neutrophils, but not necessarily only in those infected with *L. infantum*.

### Heme Increases *L. infantum* Infection and Inflammatory Activation of Human Neutrophils

Further experiments evaluated how heme could interfere in the viability of *L. infantum* inside neutrophils. We found a dose-dependent increase in intracellular parasite burden in neutrophils (Figure S1 in Supplementary Material). Incubation of infected neutrophil cultures with 30 μM heme resulted in increases in both the percentage of infected neutrophils and the number of intracellular parasites (Figure 3A). In addition, substantial increase in the viability (Figure 3B) of *L. infantum* inside neutrophils was detected in cultures treated with heme compared with those observed in untreated cultures. We next analyzed the activation status of infected neutrophils by means of ROS production and release of enzymes from neutrophilic granules. Heme is described as a strong inducer of ROS production in several models, especially in human neutrophils (8). Flow cytometry analysis revealed a significant increase in intracellular ROS generation in infected neutrophils as well as in heme-treated infected neutrophils (Figure 4A). The release of neutrophilic enzymes was further assessed in the supernatants of the same cell cultures. *L. infantum* alone triggered substantial





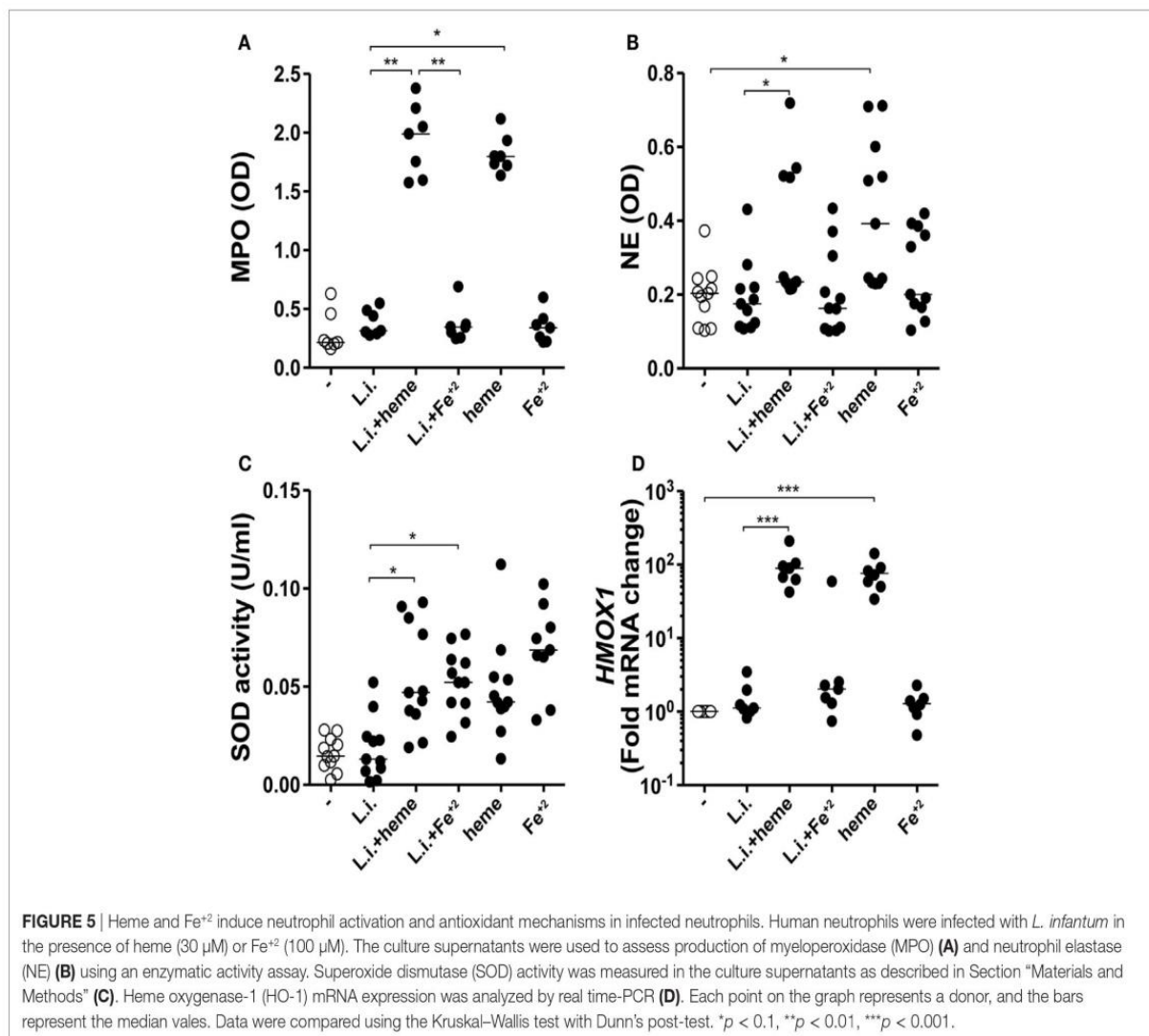
release of MMP-9 from neutrophils (**Figure 4B**) but did not induce activity of MPO and NE (**Figures 4C,D**). Cultures treated with heme alone exhibited increased MPO and NE enzymatic activity without affecting MMP-9 secretion compared to that detected in untreated cultures. When the infection of neutrophils occurred in the presence of heme, we observed a mixed pattern hallmarked by a simultaneous increase in MMP-9 levels as well as in MPO and NE activity (**Figures 4B–D**). The results so far indicate that heme drives specific changes in the inflammatory profile of neutrophils.

### Heme Drives Neutrophil Activation during *L. infantum* Infection

Infected neutrophil cultures treated with heme displayed substantial increase in both MPO (**Figure 5A**) and NE (**Figure 5B**) activity whereas treatment with iron failed to induce such effects.

It has been shown that the induction of superoxide dismutase 1 (SOD-1) favors *Leishmania* persistence (29), and that SOD-1 inhibition leads to enhanced parasite killing by human macrophages (30). In the present study, we observed that incubation of the infected neutrophil cultures with either heme or  $Fe^{2+}$  resulted in additional increases in SOD-1 activity compared with untreated infected cultures (**Figure 5C**). In previous studies, the effect of heme in promoting *Leishmania* growth has been linked to the direct induction of HO-1, as an anti-inflammatory mechanism (12, 31). We tested if the observed findings were linked to HO-1 expression in infected neutrophils. After 3 h of infection, *Hmox1* mRNA expression levels were not significantly induced in infected neutrophils treated or not with  $Fe^{2+}$  (**Figure 5D**). As expected, the presence of heme significantly increased transcription for *Hmox1* in infected human neutrophils (**Figure 5D**). These findings suggest that iron is likely dispensable for the release of granule enzymes, as well as for induction of HO-1.





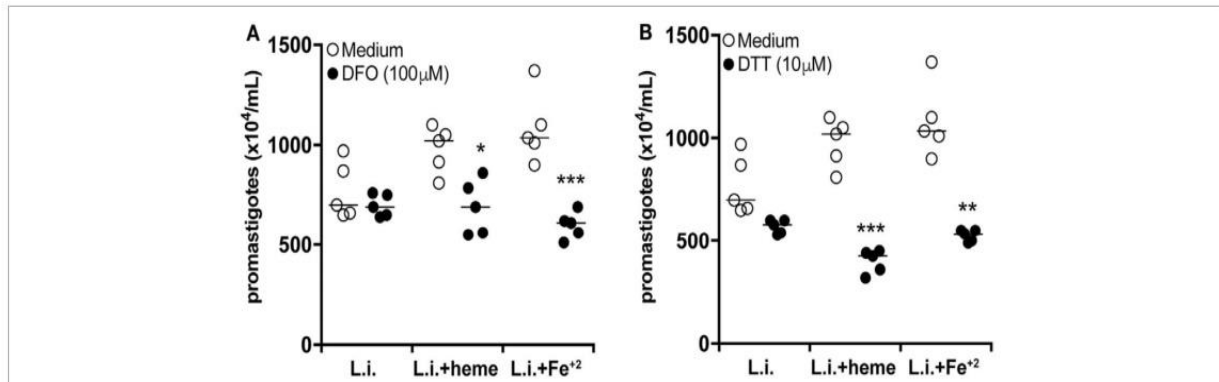
### The Effects of Heme on *L. infantum* Infection burden in neutrophils Are dependent on Iron and oxidative stress

Iron has been described to promote growth of bacteria, parasites, and other microorganisms *in vitro* (32). We then tested if iron could be the key driver of the increased parasite burden in infected neutrophils in our *in vitro* system. We observed that treatment of infected cultures with either heme or Fe<sup>2+</sup> resulted in increased parasite survival compared to untreated infected cultures (Figure 6A). Furthermore, treatment of neutrophil cultures (stimulated with either heme or Fe<sup>2+</sup>) with an iron-chelating agent [deferoxamine (DFO)] resulted in marked decrease in the intracellular parasite viability (Figure 6A). These results confirm the hypothesis that iron is an important factor driving heightened parasite burden in infected neutrophils. Accumulation of intracellular iron is usually linked to oxidative stress because Fe<sup>2+</sup> can amplify ROS generation through Fenton’s reaction (33). We therefore examined if the effects of heme and iron on parasite replication could be due to excessive ROS production. Heme or Fe<sup>2+</sup> were added to the infected neutrophil

cultures in the presence of the antioxidant dithiothreitol (DTT). We found that DTT treatment robustly dampened the intracellular parasite load (Figure 6B), reinforcing the idea that iron-driven oxidative stress is associated with increased *L. infantum* infection burden in neutrophils.

### DISCUSSION

The inflammatory response during VL is characterized by increased concentrations of circulating cytokines and inflammatory mediators, as well as by a distinct blood transcriptional profile (34). VL is associated with hematological dissemination of *Leishmania* parasites as well as occurrence of hemolytic disorders (35). The pancytopenia is characteristic of this disease, with significant reduction of red blood cells and neutrophils (neutrophil < 500 mm<sup>3</sup>) being considered a key element associated with VL clinical severity (2). Another common feature of VL is the sequestration of red blood cells and platelets in the spleen, resulting in significant anemia (36). Sequestered red cells in the spleen are phagocytized and destroyed by myeloid



**FIGURE 6 |** Heme affects neutrophil activation profile during *L. infantum* infection independent of iron. Human neutrophils were infected with *L. infantum* (1:5) in the absence or presence of heme (30  $\mu$ M) or free iron ( $\text{Fe}^{2+}$ , 100  $\mu$ M) and co-treated with the iron chelator deferroxamine (DFO) (A) or the reactive oxygen species (ROS) scavenger dithiothreitol (DTT) (B) for 3 h. The supernatant was then replaced by Schneider's medium and after 24 h viable promastigotes were counted as described in Section "Materials and Methods." The numbers of viable promastigotes ( $\times 10^4/\text{ml}$ ) are plotted. Each point on the graph represents a donor, and the bars represent the median values. Data were compared using the Kruskal–Wallis test with Dunn's post-test. \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

cells from the reticuloendothelial system (hemophagocytosis) (37, 38). In this setting, hemoglobin and other heme proteins are degraded, releasing free heme (36). We have previously described that serum concentrations of both total heme (13) and of HO-1 (12) are substantially elevated in patients with VL than in uninfected healthy endemic controls. Besides that, it has been shown that HO-1 induction favors *L. infantum* replication inside dog macrophages (39). In the present study, performed in the same patient population, we show that serum concentrations of total heme exhibit positive correlation with HO-1 and LDH levels while being negatively correlated with peripheral blood neutrophil counts, suggesting that systemic levels of heme are linked to parameters associated with increased VL disease progression. In addition, we also found a negative correlation between LDH levels and peripheral blood neutrophil counts. It is possible that the presence of higher concentrations of heme could drive the persistence of the systemic inflammation characteristic of VL and trigger inflammatory mechanisms, oxidative stress, and/or cell death in human neutrophils (6, 10, 40, 41).

Having demonstrated associations between increased concentrations of heme and lower neutrophil counts in the peripheral blood, we further employed an *in vitro* model to investigate the effects of heme on cell death of human neutrophils upon *L. infantum* infection, even though heme has by itself a clear effect on neutrophils death regardless of *Leishmania* infection. The mechanisms underlying the increased parasite viability in neutrophils activated by heme are not completely understood. It is possible that increased cell death induced by heme may have driven/favored parasite survival. Our results clearly show increase in heme concentrations in VL patients. Our working hypothesis is that there is an increased heme-driven neutrophil cell death *in vivo* in VL patients, which favors *Leishmania* persistence. We detected increased cell membrane damage/cytolysis in cultures treated with heme, as assessed by quantification of LDH release in supernatants. In addition, we carefully evaluated cell death by flow cytometry using both Annexin V (to infer apoptosis) and 7AAD (to infer necrosis) staining.

Of Note, Arruda et al. (7) have described that heme inhibits human neutrophil apoptosis, assessed by microscopy as well as Annexin V staining, after 20 h of incubation *in vitro* (7). We believe the discrepancies between findings from our and this latter study may result from employment of different experimental models and readouts. Several investigations from our group and others have reported that human neutrophils isolated by gradient methods undergo spontaneous apoptosis in as early as 6 h (21, 42, 43). Thus, evaluation of neutrophil cell death at later timepoint could compromise cell death readout. In addition, our data clearly show a pro-necrotic effect of heme on neutrophils. Importantly, such results are in agreement with other published data in the literature which demonstrate that heme induces neutrophil extracellular traps (NET) formation in neutrophils (44), necroptosis in macrophages (28) and cell death in other leukocytes (45). Further studies using more detail descriptions and different techniques may be warranted to provide a definite elucidation on the discrepancies reported with regard to the effect of heme on neutrophils *in vitro* and *in vivo*.

In the present study, we have also evaluated the effect of heme on the parasite burden and viability of *L. infantum* inside neutrophils. Culturing infected neutrophils in the presence of heme resulted in increased intracellular parasite survival, while displaying a robust inflammatory profile by means of increased production of ROS and release of MMP-9, as well as augmented MPO and NE activity. It is possible that infection-driven oxidative stress is amplified in the presence of heme, which may cause increased cell death and favor parasite survival. Thus, the results presented here corroborate with the idea that heme promotes neutrophil respiratory burst, which, in the context of *Leishmania* infection results in parasite persistence. This concept that oxidative stress favors viability and replication of the infecting pathogen has been shown in other experimental settings and with other microorganisms (46–48).

Another mechanism potentially driving increased parasite survival inside neutrophils could involve the iron pathway. Heme is an important source of iron in several cellular processes (45).



In addition, a diverse range of pathogens, including *Leishmania* species, employs capture of host heme and/or iron as an important survival mechanism (49–51). In the present study, supplementation of cell cultures with  $\text{Fe}^{+2}$  caused increase of the *Leishmania* viability inside neutrophils, arguing the parasite utilizes  $\text{Fe}^{+2}$  as nutritional source. Interestingly, iron boosted *Leishmania* survival in neutrophils without affecting the cellular release of enzymes from neutrophilic granules. Thus, these observations indicate that the mechanisms inducing activation of other neutrophil effector molecules may be distinct in this experimental model. Furthermore, although the effects on parasite survival were similar between heme and  $\text{Fe}^{+2}$ , the latter did not induce MPO and NE activity in infected neutrophils. This discrepancy between heme and  $\text{Fe}^{+2}$  potentially underlies different requirements for pathways linked to neutrophil activation and degranulation and promotion of *Leishmania* survival.

Herein, we found that heme triggers a strong intracellular oxidative response in infected neutrophils, which counterintuitively did not affect parasite survival. Accumulation of ROS, and especially superoxide anions, can react with  $\text{Fe}^{+2}$  resulting in amplification of free radicals (Fenton's reaction) (52). In excess, ROS are highly detrimental to both parasites and host cells. To circumvent the oxidative stress, host cells produce antioxidants, such as SOD-1, which catalyzes the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide (53). It has already been demonstrated that the production of SOD-1 by the host cell may provide protection against intracellular pathogens. Interestingly, some parasites can induce antioxidant responses as an escape mechanism. In human macrophages, *L. amazonensis* infection is followed by dramatic increases in SOD-1 expression and activity, which has been shown to directly favor parasite survival (29). In our experiments, *L. infantum* infection itself did not trigger increased SOD-1 activity in human neutrophils. Nevertheless, we observed a remarkable induction of SOD-1 in infected neutrophils treated with either heme or  $\text{Fe}^{+2}$ . The fact that we have also detected accumulation of intracellular ROS in the same experimental conditions associated with SOD-1 induction argues that the antioxidant response was probably insufficient to completely revert the oxidative stress, resulting in further cell death.

Another important antioxidant which has been implicated in the pathogenesis of leishmaniasis is HO-1. We have recently shown that HO-1 induction in macrophages upon *L. infantum* infection is a critical mechanism favoring the persistence of the parasites (12). Whether HO-1 influences *Leishmania* infection in neutrophils is currently unknown. Our results from the clinical study clearly indicate that the serum concentrations of this antioxidant enzyme directly correlated with the levels of total heme. The *in vitro* experiments performed in infected neutrophils demonstrated that HO-1 mRNA was significantly induced only in the presence of heme, highlighting differences in the capacity to produce HO-1 between macrophages and neutrophils. Notably, in our patient cohort, serum levels of heme were also inversely correlated with blood neutrophil counts. We speculate that heme overload in the presence of *L. infantum* infection drives neutrophil hyperactivation and

cell death, which in turn, favors parasite survival *in vivo*. These events may be directly linked to disease outcomes, but additional studies are warranted to investigate the interplay between parasite survival, heme-driven inflammation and cell death in severe VL.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

This study was carried out in accordance with the recommendations of Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe, Brazil with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe, Brazil (license number: 04587312.2.0000.0058).

### Reagents

The heme used *in vitro* assays was commercially obtained from Frontier Scientific (Logan, UT, USA). Drug was diluted immediately before use in 0.1 N sodium hydroxide (NaOH) and RPMI 1640 medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and adjusted to the concentration of 30  $\mu\text{M}$ . DTT, DFO, Iron (II) sulfate hydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) and hemin for parasite culture were commercially obtained from Sigma-Aldrich (New Road, Gillingham, United Kingdom).  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  was diluted in distilled water and adjusted to a concentration of 100  $\mu\text{M}$ , the compound in solution releases the ferrous iron ions ( $\text{Fe}^{+2}$ ). TritonX-100 was purchased from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). Cytotoxicity Detection Kit was from Roche Applied Science (Penzberg, Germany). LDH ELISA kit was from Wuxi Douglin Sci. (Wuxi, China). H2DCFDA fluorescent probe was from Invitrogen/Molecular Probes (Grand Island, NY, USA). Superoxide dismutase-1 (SOD-1) activity kit was from Cayman Chemical Company (Ann Harbor, MI, USA). Aminoactinomycin D (7-AAD) and Annexin V-labeled Ab were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

### Quantification of Serum LDH, Total Heme, and HO-1 as well as Neutrophil Counts in VL Patients

Serum of patients with VL ( $n = 33$ ) and healthy controls ( $n = 25$ ) was obtained from an endemic area in northeastern Brazil. The clinical and epidemiological characteristics of the study population have been previously described in detail (12); a subset of patients, from whom serum samples as well as information on neutrophil counts were available, was used in the present study. The quantification of serum levels of LDH, total heme and HO-1, as well as peripheral neutrophil counts were performed before antileishmanial therapy. Data on neutrophil counts were obtained from WBC counts in a clinical laboratory from the endemic area. HO-1 was measured using the ELISA kit from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA). LDH was measured in serum samples using the ELISA kit from Wuxi Douglin Sci. (Wuxi, China); and in supernatant



samples using Cytotoxicity Detection Kit from Roche Applied Science (Penzberg, Germany). Total heme was estimated by a colorimetric determination, using the QuantiChrom Heme Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

## Parasite Culture

*Leishmania infantum* promastigotes (MCAN/BR/89/Ba262) were grown in hemoflagellate-modified minimal essential medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 24.5 mM hemin at 23°C (BOD incubator). In all experiments, the cultures of *L. infantum* were used at stationary phase.

## Infection Assays

Human blood was obtained from volunteers at the Hemocentro do Estado da Bahia, BA, Brazil. Human neutrophils were isolated by gradient separation with polymorphonuclear medium (PMN) according to manufacturer's instructions (Axis-ShieldPoc AS, Oslo, Norway). Neutrophils were collected and washed three times with saline at 4°C for 10 min at 1300 RPM. Neutrophils were plated with RPMI-1640 medium, supplemented with 1% Nutridoma-SP, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Cells were infected with stationary *L. infantum* promastigotes (five parasites for one neutrophil) in the presence or absence of indicated concentrations of heme. In some experiments, neutrophils were also incubated with 10 µM DTT or 100 µM DFO. The cultures were incubated for 3 h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and infection burden was evaluated subsequently upon infection. Subsequent to infection in the presence or absence of heme or Fe<sup>2+</sup>, intracellular load of *L. infantum* in neutrophils was evaluated through viability of the parasites using the Schneider method adapted from Ribeiro-Gomes and collaborators (54). Briefly, after 3 h of incubation the infected neutrophils were centrifuged at 1,300 rpm for 10 min at 4°C and the supernatant containing not internalized promastigotes was discarded and replaced by 250 µl of Schneider medium supplemented with 20% FBS and 1% L-glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml). Then, the infected neutrophils were incubated at 23°C and after 24 h of incubation proliferating extracellular viable promastigotes were counted using Neubauer chamber. Alternatively, intracellular load of *L. infantum* was estimated using cytospin preparations stained with Diff-Quick. Number of infected neutrophils and intracellular amastigotes was quantified under light microscopy in 200 neutrophils per slide.

## Evaluation of Neutrophil Activity

After 3 h of incubation, the supernatants of infected neutrophil cultures in presence or absence of heme or Fe<sup>2+</sup> were used to test the production of metalloproteinase-9 (MMP-9) by sandwich ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). The enzymatic activity of the MPO and NE was evaluated under the same experimental conditions using a specific substrate for each enzyme, according

to a previously described protocol of Ref. (55). The results were assessed using spectrophotometry by detecting the optical density of each well at 410 nm for MPO and at 492 nm for NE, respectively.

## Assessment of Oxidative Response

Superoxide dismutase-1 activity was detected in cell free supernatant, according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical Company, MI, USA). In order to evaluate the presence of superoxide, neutrophils infected in the presence of heme or Fe<sup>2+</sup> were treated with hydroxylamine (500 µM) for 3 h. Hydroxylamine which was oxidized to nitrite was measured by spectrophotometry in the absorbance 560 nm using the optical density. For detection of ROS, subsequent to 1 h of infection in the presence of heme or Fe<sup>2+</sup>, cells were stained with 10 µM H2DCFDA fluorescent probe following analyses by FACS (Fortessa LSR II, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), according to the manufacturer's instructions. The geometric median fluorescence intensity was evaluated using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

## HO-1 mRNA Expression

Extraction of ribonucleic acid (RNA) in neutrophils infected with *L. infantum* (3 h post-infection) in presence or absence of heme was performed using Trizol Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with 250 ng of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). The obtained cDNA was stored at -20°C until further use. The qPCR was performed in an ABI 7500 FAST Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). The amplification reactions were performed with Power SYBR® Green, according to the manufacturer's instructions. The standard qPCR conditions were as follows: 10 min at 95°C, followed 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 60 s. The primers used for qPCR reactions were HO-1 (Fw: AGG CCA AGA CTG CGT TCC T and Rev: GGT GTC ATG GGT CAG CAG C) and for endogenous controls GAPDH (Fw: CAC ATG GCC TCC AAG GAG TAA and Rev: TGA GGG TCT CTC TCT TCC TCT TGT) and β-actin (Fw: CCT GGC ACC CAG CAC AAT and Rev: GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT). After amplification and dissociation curve runs, the values of threshold cycle (Ct) were obtained with the aid of the Operational Programme 7500™ System (Applied Biosystems, USA). The intra-assay precision was calculated using the equation E (-1/slope) to confirm precision and reproducibility of qPCR. The expression levels were normalized based on the geometric mean of endogenous controls. Relative expression folds were calculated based on 2<sup>-ddCt</sup> method (56).

## Neutrophil Viability Assays

Neutrophil viability was quantified by the expression of membrane phosphatidylserine detected by annexin V binding using



annexin V-FITC and 7-aminoactinomycin D nucleic dye as recommended by the manufacturer (BD Pharmingen). For LDH release assay, neutrophils ( $5 \times 10^4$  cells/well) were cultured with 30  $\mu$ M of heme, and infected with *L. infantum* promastigotes. The release of LDH was measured 3 h post heme treatment in cell-free culture supernatant by the Cytotoxicity Detection Kit. Blank LDH levels were subtracted from experimental LDH values and total LDH activity was determined by lysing the cells with 1% Triton X. Results are displayed as percent of total LDH release.

## Statistical Analysis

Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism program 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Comparisons were tested using the nonparametric Kruskal–Wallis test (for more than two experimental groups) with Dunn's multiple comparisons post-test or linear trend analysis. The Mann–Whitney *U* test was used to compare median values between two groups. Correlations were tested using the Spearman rank test. Frequencies were compared using the Fisher's exact test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . All the experiments were performed at least two times, using on average 5–6 volunteers per experiment (cells from each one of the 5–6 volunteers were exposed to different experimental conditions in each experiment).

## ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe, Brazil with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe, Brazil (license number: 04587312.2.0000.0058).

## REFERENCES

- Kedzierski L. Leishmaniasis. *Hum Vaccin* (2011) 7(11):1204–14. doi:10.4161/hv.7.11.17752
- Belic A, Pejic D, Stefanovic N, Spasojevic J, Durkovic D. [Hematologic characteristics of leishmaniasis]. *Med Pregl* (2000) 53(1–2):89–91.
- Abdelmoula MS, M'hamdi Z, Amri F, Tebib N, Ben Turkia H, Ben Dridi MF. [Visceral leishmaniasis in children: prognostic factors]. *Tunis Med* (2003) 81(8):535–9.
- Larsen R, Gouveia Z, Soares MP, Gozzelino R. Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Front Pharmacol* (2012) 3:77. doi:10.3389/fphar.2012.00077
- Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2010) 50:323–54. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600
- Graça-Souza AV, Arruda MAB, De Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* (2002) 99(11):4160–5. doi:10.1182/blood.V99.11.4160
- Arruda MA, Rossi AG, De Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graça-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol* (2004) 173(3):2023–30. doi:10.4049/jimmunol.173.3.2023
- Porto BN, Alves LS, Fernández PL, Dutra TP, Figueiredo RT, Graça-Souza AV, et al. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J Biol Chem* (2007) 282(33):24430–6. doi:10.1074/jbc.M703570200

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

GQ-C, NL, MB, BA, and VB conceived and designed the study. GQ-C, NL, FC, DZ, DA, DM, NT, and DP, performed the experiments. GQ-C, NL, CB, DP, MG, CO, RA, MB, BA, and VB contributed with data analysis. DM, RA, MB, BA, and VB provided materials and infrastructural support. GQ-C, NL, MB, BA, and VB wrote and revised the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs. Andreza Souza (LIMI, FIOCRUZ, Bahia) for technical and logistics support.

## FUNDING

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia-FAPESB (RED0018/2013 to VB) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (478480/2013-0 to VB, 552721/2011-5 and 019.203.02712/2009-8 FAPITEC/CNPq to RA). RA also received a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES: 23038.005304/2011-01). GQ-C received a fellowship from FAPESB. NL received a fellowship from CAPES. VB, MB, RA, CO, CB, and MG are senior investigators from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01620/full#supplementary-material>.

- Monteiro APT, Pinheiro CS, Luna-Gomes T, Alves LR, Maya-Monteiro CM, Porto BN, et al. Leukotriene B4 mediates neutrophil migration induced by heme. *J Immunol* (2011) 186(11):6562–7. doi:10.4049/jimmunol.1002400
- Dutra FF, Bozza MT. Heme on innate immunity and inflammation. *Front Pharmacol* (2014) 5:115. doi:10.3389/fphar.2014.00115
- Pham N-K, Mouriz J, Kima PE. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. *Infect Immun* (2005) 73(12):8322–33. doi:10.1128/IAI.73.12.8322-8333.2005
- Luz NF, Andrade BB, Feijo DF, Araujo-Santos T, Carvalho GQ, Andrade D, et al. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. *J Immunol* (2012) 188(9):4460–7. doi:10.4049/jimmunol.1103072
- Farias Luz N, Balaji S, Okuda K, Barreto AS, Bertin J, Gough PJ, et al. RIPK1 and PGAM5 control *Leishmania* replication through distinct mechanisms. *J Immunol* (2016) 196(12):5056–63. doi:10.4049/jimmunol.1502492
- Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol* (2012) 2:59. doi:10.3389/fcimb.2012.00059
- Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F. Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. *Trends Parasitol* (2016) 32(5):392–401. doi:10.1016/j.pt.2016.02.003
- Miralda I, Uriarte SM, Mcleish KR. Multiple phenotypic changes define neutrophil priming. *Front Cell Infect Microbiol* (2017) 7:217. doi:10.3389/fcimb.2017.00217



17. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* (2007) 28(8):340–5. doi:10.1016/j.it.2007.06.002
18. Nauseef WM. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol* (2014) 16(8):1146–55. doi:10.1111/cmi.12312
19. Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, Dosreis GA, Dutra AN, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol* (2008) 84(2):389–96. doi:10.1189/jlb.0108018
20. Novais FO, Santiago RC, Bafica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol* (2009) 183(12):8088–98. doi:10.4049/jimmunol.0803720
21. Prates DB, Araújo-Santos T, Luz NF, Andrade BB, França-Costa J, Afonso L, et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *J Leukoc Biol* (2011) 90(3):575–82. doi:10.1189/jlb.0211105
22. Tavares NM, Araújo-Santos T, Afonso L, Nogueira PM, Lopes UG, Soares RP, et al. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTb4 derived from human neutrophils. *J Infect Dis* (2014) 210(4):656–66. doi:10.1093/infdis/jiu158
23. Falcao SA, Weinkopf T, Hurrell BP, Celes FS, Curvelo RP, Prates DB, et al. Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. *PLoS Negl Trop Dis* (2015) 9(3):e0003601. doi:10.1371/journal.pntd.0003601
24. Ballas SK. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. *Blood* (2013) 121(1):243–4. doi:10.1182/blood-2012-10-462135
25. Andrade BB, Araújo-Santos T, Luz NF, Khouri R, Bozza MT, Camargo LMA, et al. Heme impairs prostaglandin E2 and TGF-beta production by human mononuclear cells via Cu/Zn superoxide dismutase: insight into the pathogenesis of severe malaria. *J Immunol* (2010) 185(2):1196–204. doi:10.4049/jimmunol.0904179
26. Gozzelino R, Andrade BB, Larsen R, Luz NF, Vanoaica L, Seixas E, et al. Metabolic adaptation to tissue iron overload confers tolerance to malaria. *Cell Host Microbe* (2012) 12(5):693–704. doi:10.1016/j.chom.2012.10.011
27. Carvalho MOS, Araujo-Santos T, Reis JHO, Rocha LC, Cerqueira BAV, Luz NF, et al. Inflammatory mediators in sickle cell anaemia highlight the difference between steady state and crisis in paediatric patients. *Br J Haematol* (2017). doi:10.1111/bjh.14896
28. Fortes GB, Alves LS, De Oliveira R, Dutra FF, Rodrigues D, Fernandez PL, et al. Heme induces programmed necrosis on macrophages through auto-crine TNF and ROS production. *Blood* (2012) 119(10):2368–75. doi:10.1182/blood-2011-08-375303
29. Khouri R, Bafica A, Silva MDPP, Noronha A, Kolb J-P, Wietzerbin J, et al. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* (2009) 182(4):2525–31. doi:10.4049/jimmunol.0802860
30. Celes FS, Trovati E, Khouri R, Van Weyenbergh J, Ribeiro SJ, Borges VM, et al. DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Sci Rep* (2016) 6:38330. doi:10.1038/srep38330
31. Dey S, Bindu S, Goyal M, Pal C, Alam A, Iqbal MS, et al. Impact of intravascular hemolysis in malaria on liver dysfunction: involvement of hepatic free heme overload, NF-kappaB activation, and neutrophil infiltration. *J Biol Chem* (2012) 287(32):26630–46. doi:10.1074/jbc.M112.341255
32. Cassat JE, Skaar EP. Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe* (2013) 13(5):509–19. doi:10.1016/j.chom.2013.04.010
33. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans* (1894) 65:899–911. doi:10.1039/CT8946500899
34. Gardinassi LG, Garcia GR, Costa CH, Costa Silva V, De Miranda Santos IK. Blood transcriptional profiling reveals immunological signatures of distinct states of infection of humans with *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10(11):e0005123. doi:10.1371/journal.pntd.0005123
35. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* (2007) 5(11):873–82. doi:10.1038/nrmicro1748
36. Thakur AK, Bimal S, Singh SK, Gupta AK, Das VN, Das P, et al. Degree of anemia correlates with increased utilization of heme by *Leishmania donovani* parasites in visceral leishmaniasis. *Exp Parasitol* (2013) 135(3):595–8. doi:10.1016/j.exppara.2013.09.008
37. Boukhris I, Azzabi S, Cherif E, Kechaou I, Mahjoub S, Kooli C, et al. [Hemophagocytosis and disseminated intravascular coagulation in visceral leishmaniasis in adults: three new cases]. *Pan Afr Med J* (2015) 22:96. doi:10.11604/pamj.2015.22.96.5662
38. Goto Y, Cheng J, Omachi S, Morimoto A. Prevalence, severity, and pathogenesis of anemia in visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* (2017) 116(2):457–64. doi:10.1007/s00436-016-5313-x
39. Almeida BFM, Silva KLO, Venturin GL, Chiku VM, Leal AAC, Bosco AM, et al. Induction of haem oxygenase-1 increases infection of dog macrophages by *L. infantum*. *Parasite Immunol* (2017) e12494. doi:10.1111/pim.12494
40. Araujo-Santos T, Andrade BB, Gil-Santana L, Luz NF, Dos Santos PL, De Oliveira FA, et al. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. *Sci Rep* (2017) 7(1):4334. doi:10.1038/s41598-017-04595-8
41. Gardinassi LG, Desouza-Vieira TS, Da Silva NO, Garcia GR, Borges VM, Campos RNS, et al. Molecular signatures of neutrophil extracellular traps in human visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors* (2017) 10(1):285. doi:10.1186/s13071-017-2222-5
42. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* (1989) 83(3):865–75. doi:10.1172/JCI113970
43. Whyte M, Renshaw S, Lawson R, Bingle C. Apoptosis and the regulation of neutrophil lifespan. *Biochem Soc Trans* (1999) 27(6):802–7. doi:10.1042/bst027a134
44. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood* (2014) 123(24):3818–27. doi:10.1182/blood-2013-10-529982
45. Soares MP, Bozza MT. Red alert: labile heme is an alarmin. *Curr Opin Immunol* (2016) 38:94–100. doi:10.1016/j.coi.2015.11.006
46. Paiva CN, Feijó DF, Dutra FF, Carneiro VC, Freitas GB, Alves LS, et al. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest* (2012) 122(7):2531–42. doi:10.1172/JCI58525
47. Paiva CN, Bozza MT. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid Redox Signal* (2014) 20(6):1000–37. doi:10.1089/ars.2013.5447
48. Amaral EP, Conceicao EL, Costa DL, Rocha MS, Marinho JM, Cordeiro-Santos M, et al. N-acetyl-cysteine exhibits potent anti-mycobacterial activity in addition to its known anti-oxidative functions. *BMC Microbiol* (2016) 16(1):251. doi:10.1186/s12866-016-0872-7
49. Carvalho S, Cruz T, Santarem N, Castro H, Costa V, Tomas AM. Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. *Acta Trop* (2009) 109(2):131–5. doi:10.1016/j.actatropica.2008.10.007
50. Huynh C, Yuan X, Miguel DC, Renberg RL, Protchenko O, Philpott CC, et al. Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1. *PLoS Pathog* (2012) 8(7):e1002795. doi:10.1371/journal.ppat.1002795
51. Mittra B, Laranjeira-Silva MF, Perrone Bezerra De Menezes J, Jensen J, Michailowsky V, Andrews NW. A trypanosomatid iron transporter that regulates mitochondrial function is required for *Leishmania amazonensis* virulence. *PLoS Pathog* (2016) 12(1):e1005340. doi:10.1371/journal.ppat.1005340
52. Gozzelino R, Arosio P. The importance of iron in pathophysiologic conditions. *Front Pharmacol* (2015) 6:26. doi:10.3389/fphar.2015.00026
53. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal* (2011) 15(6):1583–606. doi:10.1089/ars.2011.3999
54. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* (2004) 172(7):4454–62. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4454
55. Tavares N, Afonso L, Suarez M, Prates DB, Araújo-Santos T, et al. Degranulating neutrophils promote leukotriene B 4 production by infected

- macrophages to kill *Leishmania amazonensis* parasites. *J Immunol* (2016) 196(4):1865–73. doi:10.4049/jimmunol.1502224
56. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* (2001) 29(9):e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45

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

Copyright © 2017 Quintela-Carvalho, Luz, Celes, Zanette, Andrade, Menezes, Tavares, Brodskyn, Prates, Gonçalves, de Oliveira, Almeida, Bozza, Andrade and Borges. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 4. PARTE II

### 4.1 HIPÓTESE

A ausência do lipofosfoglicano (LPG) de superfície na *Leishmania infantum* dificulta o estabelecimento da infecção em neutrófilos humanos.

### 4.2 OBJETIVOS

#### 4.2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel do lipofosfoglicano na interação da *Leishmania infantum* com neutrófilos humanos.

#### 4.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar carga parasitária de neutrófilos humanos durante a infecção por cepas de *L. infantum* deficientes de LPG ou geneticamente restituídas;
- Caracterizar a atividade inflamatória de neutrófilos humanos infectados por *L. infantum* deficiente de LPG ou geneticamente restituídas;
- Investigar os mecanismos oxidativos induzidos nos neutrófilos humanos em resposta a infecção por cepas de *L. infantum* deficientes de LPG ou geneticamente restituídas;
- Analisar o envolvimento do LPG de *L. infantum* na indução de dano celular em neutrófilos humanos.

#### 4.3 MANUSCRITO II

##### **A INFECCÃO DISTINTA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS POR PROMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum* DEFICIENTES NA BIOSÍNTESE DE LIPOFOSFOGLICANO.**

O trabalho avalia como o LPG de superfície de *L. infantum* contribui para estabelecimento inicial da infecção durante a interação com neutrófilos humanos.

Resumo:

O lipofosfoglicano (LPG), presente somente nas formas promastigotas de *Leishmania*, é associado ao estabelecimento do parasito no hospedeiro vertebrado. Entretanto poucos trabalhos demonstram a relação LPG-neutrófilos nos momentos iniciais da infecção. Para explorar esse contexto, neutrófilos humanos foram infectados com *L. infantum* do tipo selvagem (WT), *L. infantum* deficiente de LPG ( $\Delta lpg1$ ) ou *L. infantum* com LPG restituído ( $\Delta lpg1$ +LPG1). As formas  $\Delta lpg1$  apresentaram maior taxa de infecção e amastigotas/neutrófilos quando comparadas com parasitos que tinham a molécula de LPG, o WT e  $\Delta lpg1$ +LPG1. No entanto, os parasitos  $\Delta lpg1$  mostraram uma menor taxa de viabilidade em comparação com as formas de *L. infantum* WT ou  $\Delta lpg1$ +LPG1. A expressão das moléculas de ativação na superfície dos neutrófilos não foi significativa entre os grupos infectados. Apenas a metaloproteinase-8 (MMP-8) apresentou aumento devido à infecção com *L. infantum*  $\Delta lpg1$  comparada à forma WT, enquanto a atividade de mieloperoxidase (MPO), elastase neutrofílica (NE) e liberação de metaloproteinase 9 (MMP-9) não foi alterada entre os neutrófilos infectados. A análise por citometria de fluxo revelou produção expressiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) durante a infecção dos neutrófilos com os parasitos  $\Delta lpg1$  e a inibição da via oxidativa pôde restaurar a viabilidade intracelular dessas *Leishmanias* sem o LPG. Nós também analisamos a liberação de ácido desoxirribonucleico (DNA) e lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das culturas e notamos que o dano celular foi maior quando os neutrófilos foram infectados com *L. infantum*  $\Delta lpg1$ . Este estudo abre novas perspectivas para o entendimento entre a interação do LPG e mecanismos de ativação neutrofílica implicados na resposta inicial do sistema imune a infecção.

O artigo referente a esse trabalho está em construção.

## 4.4 INTRODUÇÃO

### 4.4.1 A Molécula de Lipofosfoglicano (LPG)

O LPG é expresso apenas nas formas promastigotas de *Leishmania*, constituindo a molécula mais abundante em sua superfície (PRIV; DESCOTEAUX, 2000). A estrutura básica do LPG é altamente conservada em todas as espécies de *Leishmania* e é composta por repetições de Gal $\beta$ 1-4Man $\alpha$ 1-PO<sub>4</sub> (polímeros dissacarídeo fosfato) ligados a superfície do glicocálix por uma âncora de GPI (NADERER; VINCE; MCCONVILLE, 2004).

Para infectar o hospedeiro vertebrado, a *Leishmania* tem que primeiramente sobreviver dentro do intestino médio do inseto vetor. O LPG, além de proteger esses parasitos de enzimas digestivas (BUTCHER et al., 1996), permite que estes se mantenham aderidos ao epitélio intestinal do flebótomo até passarem por diversos estágios de diferenciação e transformarem-se em formas promastigotas metacíclicas ou infectivas, em um processo denominado metaciclogênese (DESCOTEAUX; TURCO, 1999). Ao final do processo, as moléculas de LPG diminuem sua afinidade ao endotélio do intestino médio e permitem que as promastigotas metacíclicas migrem para a faringe em preparação para a transmissão ao hospedeiro vertebrado.

No hospedeiro vertebrado, diversas funções foram atribuídas à presença do LPG na superfície da *Leishmania*. Ainda na corrente sanguínea, a molécula de LPG proporciona proteção contra a destruição do parasito pelo sistema de complemento (BRITTINGHAM; MOSSER, 1996) e permite a ligação de proteínas C-reativas que opsonizam as formas promastigotas facilitando a fagocitose por macrófagos (CULLEY et al., 1996). Entretanto, o LPG de *L. major* foi identificado com um potente agonista de TLR-2 em macrófagos murinos e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) ocasionando a produção de mediadores inflamatórios e ROS (BECKER et al., 2003; KAVOOSI et al., 2010).

Subsequente a internalização por macrófagos, promastigotas de *L. donovani* e *L. major* foram capazes de inibir a fusão do fagossomo com lisossomos através das suas moléculas de LPG (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997; DERMINE et al., 2000). De modo ainda a contribuir com o sucesso da infecção, a molécula de LPG age como um potente inibidor da atividade da proteína quinase C (DESCOTEAUX; MATLASHEWSKI; TURCO, 1992; GIORGIONE; TURCO; EPAND, 1996) que tem um papel central na regulação de sinais

para atividades microbidas de macrófagos. Além disso, mostrou-se capaz de inibir a associação da NADPH-oxidase citosólica aos componentes p47phox e p67phox na membrana do fagossomo, impedindo a geração de superóxido (LODGE; DIALLO; DESCOTEAUX, 2006).

Dados do nosso grupo demonstraram que o LPG isolado de *L. infantum* induziu em macrófagos a produção de HO-1 (LUZ et al., 2012). Em outros dados mais recentes, vimos que o mesmo isolado ativou a via de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ) associada à sinalização inflamatória (LIMA et al., 2017). Contudo, a infecção de macrófagos com *L. infantum* deficientes de LPG ( $\Delta lpg1$ ) foi reduzida em comparação a das formas selvagens (LÁZARO-SOUZA et al., 2018).

Enquanto a maioria dos estudos tem centrado no papel do LPG na interação de promastigotas com macrófagos, é provável que o LPG tenha um papel semelhante, se não mais importante, na sobrevivência de promastigotas em neutrófilos, por ser a principal célula hospedeira nas fases iniciais da infecção (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). A utilização de cepas de *L. infantum* deficientes na produção de LPG ( $\Delta lpg1$ ), produzidas no trabalho de Lázaro-Souza (2018), nos permite explorar essas fases da infecção na presença dos neutrófilos.

#### 4.4.2 LPG e sua Relação com os Neutrófilos

Os neutrófilos migram rapidamente para o local de inoculação da *Leishmania*, fagocitam esses parasitos e alguns conseguem sobreviver nessas células hospedeiras da imunidade inata. Sendo assim, neutrófilos podem proporcionar um abrigo temporário para a *Leishmania* antes da sua entrada em macrófagos, dentro dos quais os parasitos serão replicados (CHARMOY et al., 2010).

Foi demonstrado por Gueirard e colaboradores que apesar do forte arsenal microbida exibido por neutrófilos, alguns promastigotas de *L. donovani* conseguem sobreviver nestes fagócitos por estarem em compartimentos derivados do retículo endoplasmático, impedidos de se fundir com organelas lisossomais (GUEIRARD et al., 2008). Durante a infecção dos neutrófilos com *L. donovani* deficientes de LPG, houve a formação de compartimentos lisossomais contendo o parasito, fato não observado nos neutrófilos infectados com *L. donovani* selvagem. Segundo os autores, este resultado

evidencia que o LPG presente nos promastigotas selvagens consegue impedir a fusão entre fagossomo e lisossomo, permitindo a sobrevivência da *Leishmania* dentro do neutrófilo (GUEIRARD et al., 2008).

A molécula de LPG também mostrou relação com ativação de neutrófilos para morte ou contenção de patógenos. O LPG purificado de *L. amazonensis* induziu a liberação de NETs em neutrófilos humanos, como potencial agente leishmanicida (GUIMARAES-COSTA et al., 2009). Entretanto, com a infecção de neutrófilos humanos por *L. donovani* deficientes de LPG houve a liberação das NETs independente da presença de LPG (GABRIEL et al., 2010). Porém foi observado que o LPG confere resistência a *L. donovani* à atividade tóxica das NETs (GABRIEL et al., 2010). Temos então, que a presença do LPG em diferentes espécies de *Leishmania* conduz a eventos distintos sob as mesmas condições, possivelmente necessários para adaptação do parasito ao neutrófilo.

Em conjunto, observamos que são poucos os trabalhos que exploram a interação do LPG com os neutrófilos. Alguns desses estudos são relacionados à *L. donovani*, porém não há relatos na literatura sobre a interação de neutrófilos com o LPG de *L. infantum*, principal agente etiológico da LV no Brasil. A partir disso, torna-se relevante explorar a interação do LPG de *L. infantum* com neutrófilos humanos a fim de caracterizar como ocorre o estabelecimento inicial da infecção com esta espécie do parasito.



## 4.5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.5.1 Obtenção de Neutrófilos Humanos

Sangue humano foi obtido de voluntários do Hemocentro do Estado da Bahia (HEMOBA). O sangue coletado passou por um gradiente com o meio de separação de PMN conforme instruções do fabricante (Axis-ShieldPoc AS, Oslo, Norway), para o isolamento dos neutrófilos humanos segundo Afonso e colaboradores (AFONSO et al., 2008). Brevemente, o sangue foi centrifugado por 30 minutos a 1300 RPM em temperatura ambiente. Após a centrifugação, duas bandas são detectáveis: a primeira constituída de células mononucleares e a segunda banda formada por polimorfonucleares, basicamente neutrófilos. Assim, os neutrófilos são coletados e lavados três vezes com salina a 4°C por 10 minutos a 1200 RPM. Esse método permite uma população purificada com cerca de 94% de neutrófilos. Os neutrófilos são plaqueados na concentração de  $5 \times 10^5$  por poço, em placas de 96 poços, com meio RPMI 1640 suplementado com Nutridoma-SP 1% e 1% de L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml.

### 4.5.2 Obtenção das Cepas de *L. infantum* Deficientes de LPG ou Geneticamente Restituídas

Promastigotas de *L. infantum* (cepa BH46 ou cepa Ba262) foram disponibilizadas em colaboração com Albert Descoteaux (Institut National de La Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier). Os isolados isogênicos de parasitos deficientes de LPG ( $\Delta lpg1$ ) foram obtidos segundo descrito anteriormente (LÁZARO-SOUZA et al., 2018; PRIV; DESCOTEAUX, 2000). Resumidamente, *L. infantum* deficientes de LPG tiveram a inativação do gene LPG1 e perderam a habilidade para montar o núcleo glicano (“core”), impedindo a adição das unidades repetitivas de açúcares e por conseguinte a síntese de LPG. Além dos parasitos deficientes em LPG ( $\Delta lpg1$ ), também foram obtidos os isolados reconstituídos geneticamente ( $\Delta lpg1$ +LPG1). Para infecções, promastigotas selvagens WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 foram usadas em fase estacionária de crescimento (LÁZARO-SOUZA et al., 2018).

#### 4.5.3 Cultivo de *L. infantum*

Os parasitos foram cultivados em meio HOMEM completo, em pH neutro e armazenados em estufa BOD a 25°C. Parasitos geneticamente modificados, para impedir a síntese de LPG foram cultivados em meio HOMEM acrescido de Higromicina B 50ug/mL, G418 70µg/mL e parasitos restituídos geneticamente em meio acrescido de Higromicina 50ug/mL, G418 5ug/mL, Zeocina 80ug/mL (LÁZARO-SOUZA et al., 2018).

#### 4.5.4 Marcação de *L. infantum* com CFSE

Nos ensaios de fluorescência, foram utilizados parasitos WT,  $\Delta lpg1$  e  $\Delta lpg1+LPG1$  emitindo fluorescência verde a partir da marcação com 5(6)-Éster de carboxifluoresceína succinimidil (Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit). O CFSE ao ser internalizado é clivado, se associando a proteínas do citoesqueleto e assim fica impedido de sair da célula, que passa a emitir fluorescência verde. Os promastigotas de *L. infantum* foram incubados com CFSE na concentração de 2µM. Após 10 minutos de incubação, os parasitos foram lavados 3 vezes em tampão PBS 1 X para retirada do excesso de CFSE.

#### 4.5.5 Padronização da Infecção

Os neutrófilos humanos foram plaqueados na concentração de  $5 \times 10^5$  por poço, com promastigotas estacionárias de *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1+LPG1$  a uma taxa de infecção 1:10 (neutrófilo:parasito). As culturas são incubadas durante 3h para posteriormente avaliarmos a infecção.

#### 4.5.6 Viabilidade por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Após 3h de infecção com a *L. infantum* WT ou  $\Delta lpg1$ , os neutrófilos foram lavados, coletados e fixados em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, com 1% de glutaraldeído (Sigma-Aldrich), 4% de formaldeído e 5mM de  $CaCl_2$ . Posteriormente, foram pós-fixadas em 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 de cortadas em secções ultrafinas, as células foram coradas em acetato de uranila e citrato para observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 e registro de imagens representativas.

#### 4.5.7 Marcação para Identificação de Vacúolo Ácido

Neutrófilos humanos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 marcadas com CFSE e incubados com *LysoTracker* red (Molecular Probes). O *LysoTracker* é um corante fluorescente que se acumula em compartimentos celulares com pH ácido. Após 3 horas, foi feita a marcação nuclear com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e as amostras foram observadas através do microscópio de fluorescência.

#### 4.5.8 Inibição da Liberação de Enzimas Lisossomais

Neutrófilos humanos foram incubados com *Wortmannin* (500nM – SIGMA), um inibidor de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-Kinase), molécula associada a movimentações do citoesqueleto. Após 30 minutos, esses neutrófilos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 e após 3h, a viabilidade dos parasitos foi verificada pela adaptação do método do Schneider, descrito abaixo.

#### 4.5.9 Quantificação da Carga Parasitária de Neutrófilos Infectados por *L. infantum*

Após os períodos de infecção, a carga intracelular das *Leishmanias* nos neutrófilos foi avaliada em lâminas preparadas através do citospin, seguidas de coloração por hematoxilina-eosina (HE). Utilizando o microscópio óptico, foi feita uma contagem à cega de 200 células para a quantificação do percentual de neutrófilos infectados, bem como a quantidade de amastigotas por neutrófilo. Além da quantificação por microscopia óptica, foi realizada a leitura dos parasitos viáveis utilizando uma adaptação do método do Schneider, de Ribeiro-Gomes e colaboradores (RIBEIRO-GOMES et al., 2004). Resumidamente, após o período de incubação, os neutrófilos infectados são

centrifugados a 1300 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo promastigotas não internalizados é descartado e substituído por 250 µl de meio HOMEM. Em seguida, os neutrófilos infectados são incubados na estufa BOD 22°C e após 24h de incubação, foi realizada a contagem das formas promastigotas viáveis livres no meio em câmaras de Neubauer.

#### 4.5.10 Caracterização do Status de Ativação dos Neutrófilos

Avaliamos o perfil de ativação dos neutrófilos infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 a partir da expressão de moléculas de superfície, liberação de enzimas presentes nos grânulos neutrofílicos e resposta oxidativa. A expressão de moléculas presentes na superfície dos neutrófilos foi detectada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos específicos para CD11b, CD18, CD62-L e CD16 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Para aquisição dos eventos nas amostras, utilizamos o programa Cell Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e para analisar os resultados, o programa FlowJow (Tree Star, Ashland, OR, USA). A frequência das células expressando CD11b, CD18, CD62-L e CD16 foi comparada entre o grupo controle de neutrófilos não infectados e os neutrófilos infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1. Para analisar a liberação das enzimas neutrofílicas, os sobrenadantes das culturas de neutrófilos infectados foram coletados e imediatamente testados para a produção de metaloproteinase-9 (MMP-9), de acordo com as instruções do fabricante (R&D systems, Minneapolis, USA). A atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e da elastase neutrofílica (NE) foi mensurada nas mesmas condições experimentais por teste colorimétrico, utilizando-se um protocolo adaptado de Ribeiro-Gomes e colaboradores (RIBEIRO-GOMES et al., 2007).

Para registro da atividade oxidativa, após 1h de interação entre os neutrófilos humanos e os estímulos *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 foi realizada a incubação dessas células com a sonda fluorescente *Dihydroethidium* (DHE) (10µM – Invitrogen/Molecular Probes, Grand Island, NY, USA) por 30 minutos. Ao entrar nas células, a sonda DHE é oxidada por ânions superóxidos emitindo fluorescência vermelha, sendo detectada por citometria de fluxo (FACS Calibur).

#### 4.5.11 Inibição da Resposta Oxidativa

Neutrófilos humanos foram incubados com Apocinina (20  $\mu$ M; Sigma) ou N-Acetilcisteína (NAC; 20  $\mu$ M; Sigma), agentes antioxidantes, por 1h e então, estimulados com promastigotas de *L. infantum* WT,  $\Delta$ *lpg1* ou  $\Delta$ *lpg1*+LPG1. Após 30 minutos de interação, a produção de ROS foi mensurada por citometria de fluxo. Também avaliamos essa interação após 3h para contagem de parasitos viáveis por adaptação do método do Schneider, já citado anteriormente.

#### 4.5.12 Detecção de Dano Celular

Neutrófilos humanos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta$ *lpg1* ou  $\Delta$ *lpg1*+LPG1 por 3h. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a 3000 RPM por 10min para remoção dos parasitos. O dano celular foi associado a quantidade de ácido desoxirribonucleico (DNA) extracelular (Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit – Invitrogen) ou a porcentagem de lactato desidrogenase (LDH) liberado nesses sobrenadantes por ensaio colorimétrico (LDH Cytotoxicity Detection Kit - Boehringer Mannheim).

#### 4.5.13 Análise Estatística

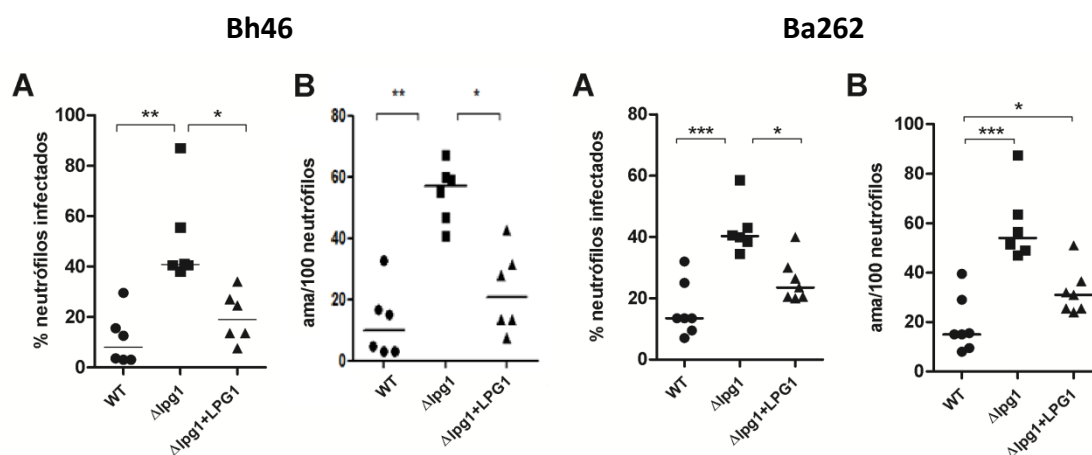
As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o programa GraphPad-Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). As comparações foram feitas utilizando-se o teste não paramétrico One-way ANOVA Kruskal-Wallis (para mais de duas amostras) com pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.6.1 Quantificação da Carga Parasitária e de Parasitos Viáveis de *L. infantum* WT, $\Delta lpg1$ ou $\Delta lpg1$ +LPG1 em Neutrófilos Humanos

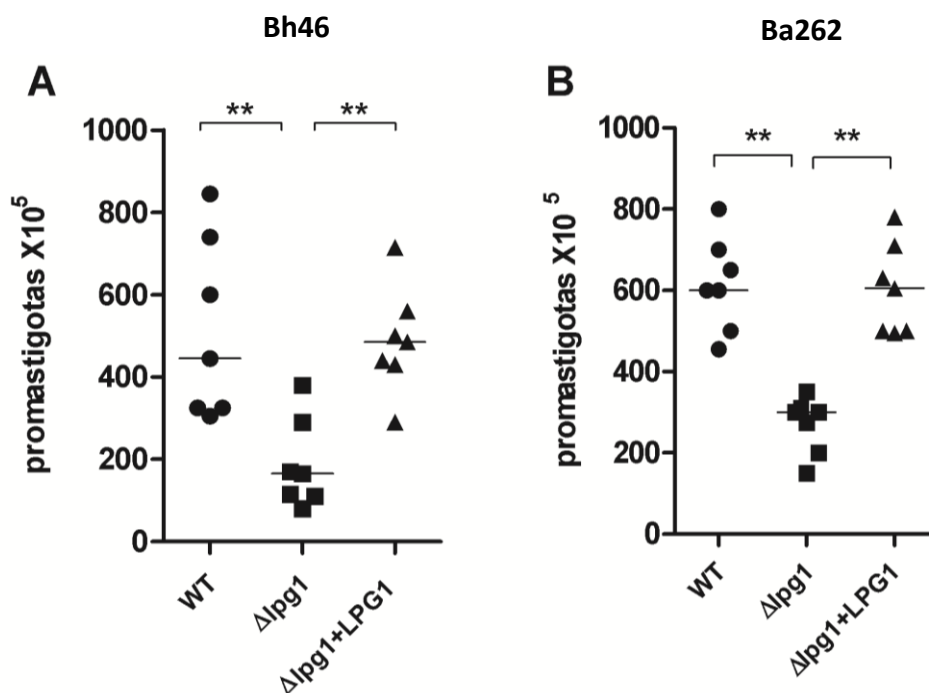
Primeiramente, avaliamos se a ausência do LPG poderia interferir na carga parasitária da *L. infantum* em neutrófilos humanos infectados. Brevemente, neutrófilos foram obtidos do sangue de doadores voluntários saudáveis e infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 da cepa Bh46 ou da cepa Ba262, na proporção de 1:10 (neutrófilo:parasito) em meio RPMI suplementado. Após 3h de infecção, a carga intracelular de *L. infantum* nos neutrófilos foi avaliada em lâminas preparadas através do citospin, seguidas de coloração por hematoxilina-eosina (HE).

Utilizando o microscópio óptico, fizemos uma contagem à cega de 200 células para a quantificação do percentual de neutrófilos infectados, bem como a quantidade de amastigotas por neutrófilo. Os resultados mostraram que nas células infectadas pelos parasitos  $\Delta lpg1$  das cepas Bh46 ou Ba262, a taxa de infecção e de amastigotas por célula foi superior à dos parasitos que possuíam a molécula de LPG em seu glicocálix, *L. infantum* WT e  $\Delta lpg1$ +LPG1. Isso indica que a ausência do LPG na cepa Bh46 ou na cepa Ba262 de *L. infantum* favorece a infecção em neutrófilos humanos (Figura 6).



**Figura 6. Infecção de neutrófilos com cepa Bh46 ou com cepa Ba262 de *L. infantum* deficientes de LPG.** Neutrófilos humanos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 (1:10) da cepa Bh46 ou da cepa Ba262. Após 3h, os neutrófilos foram citocentrifugados e corados com HE para avaliação da carga parasitária por microscopia óptica. (A) Indica o percentual de neutrófilos infectados e (B) o número de amastigotas por 100 neutrófilos. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (\*,  $p < 0,05$ ) (\*\*,  $p < 0,01$ ) (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

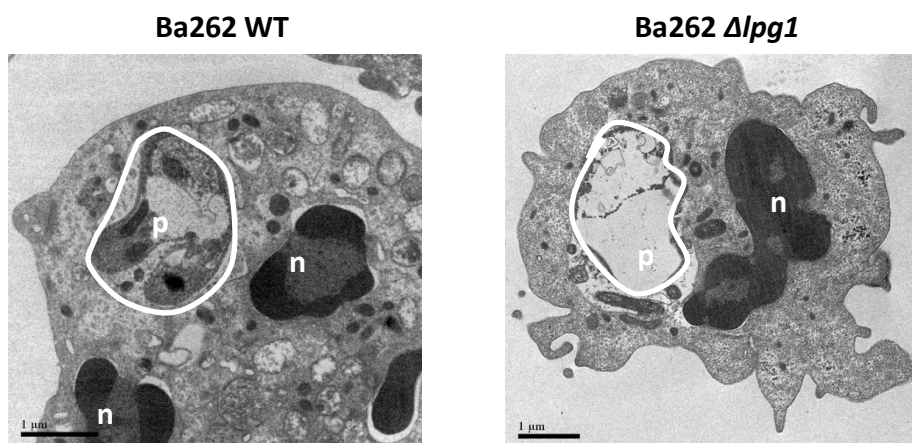
Para avaliarmos a viabilidade, sob as mesmas condições de infecção descritas acima, após 3h realizamos a substituição do meio RPMI pelo meio HOMEM (meio de cultivo para promastigotas de *Leishmania*). Após 24h, os promastigotas viáveis das cepas Bh46 ou Ba262 liberados no sobrenadante destas culturas foram contados. Ao analisarmos a contagem, obtivemos um número menor de parasitos  $\Delta lpg1$  ao ser comparado com o número de parasitos viáveis da *L. infantum* WT ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 (Figura 7) de ambas as cepas. Isso indica que apesar da fagocitose de formas  $\Delta lpg1$  das cepas Bh46 ou Ba262 estar aumentada durante a infecção inicial (como visto nos dados de avaliação da carga na Figura 6), estes parasitos não conseguiram sobreviver dentro do neutrófilo. Por outro lado, as *Leishmanias* WT e  $\Delta lpg1$ +LPG1 que possuem o LPG intacto ou restituído, respectivamente, foram menos fagocitadas na infecção inicial, mas conseguiram sobreviver mais, sugerindo que a presença do LPG tem um efeito protetor para a *Leishmania* no interior de neutrófilos.



**Figura 7. Viabilidades dos promastigotas de *L. infantum* liberados em meio HOMEM após a infecção de neutrófilos.** Neutrófilos humanos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 (1:10) da cepa Bh46 (A) ou da cepa Ba262 (B) por 3h. Em seguida, o sobrenadante foi substituído por meio HOMEM e depois de 24h foi realizada a contagem de promastigotas viáveis liberadas no sobrenadante. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (\*\*,  $p < 0,01$ ).

As cepas utilizadas de *L. infantum* diferem pelo fato da Bh46 ter sido isolada de humano, enquanto a cepa Ba262 foi isolada de cão. Além disso, estas cepas apresentam diferenças estruturais no LPG que poderiam interferir no estabelecimento da infecção, o que não foi observado (Figura 6 e 7). A partir disso, seguimos somente com utilização da cepa Ba262 por já ter sido utilizada em trabalhos anteriores do grupo e assim, os ensaios já estarem padronizados (LÁZARO-SOUZA et al., 2018).

Os achados da Figura 7 foram confirmados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As micrografias eletrônicas mostram a ultraestrutura da célula intacta, com presença de grânulos no citoplasma. No neutrófilo infectado pela *L. infantum* WT, o parasito internalizado aparece íntegro, sugerindo que a forma selvagem consegue sobreviver no interior desta célula (Figura 8). Em contrapartida, observamos o parasito  $\Delta lpg1$  destruído dentro do vacúolo do neutrófilo.



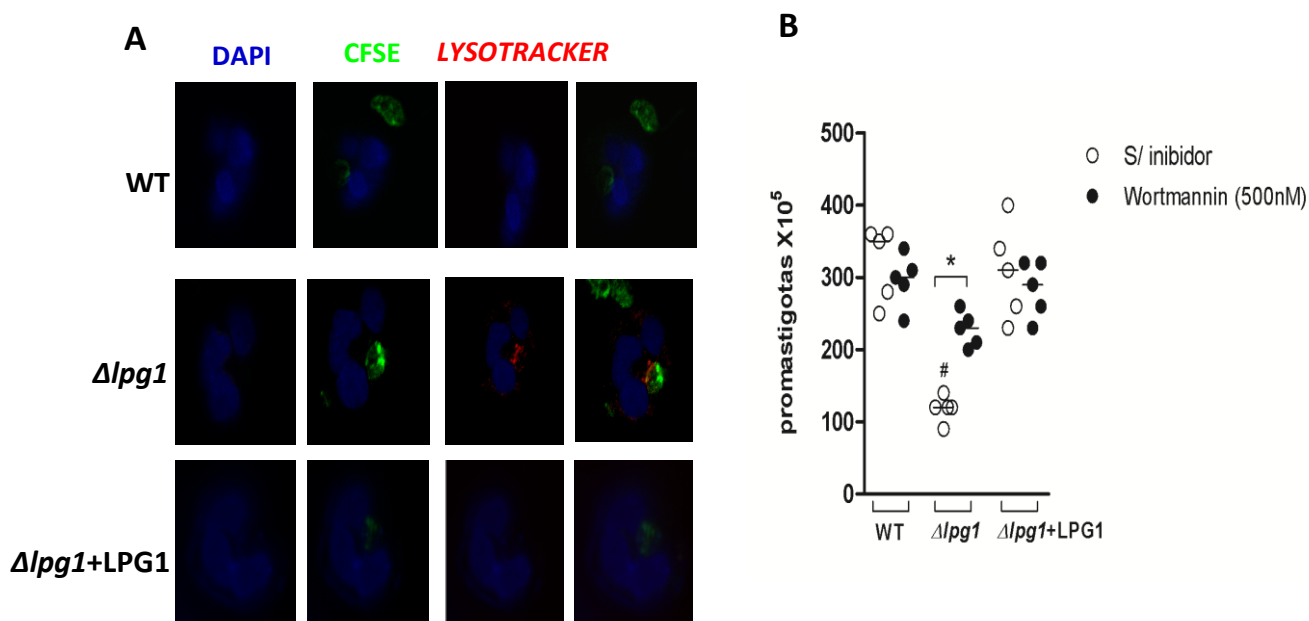
**Figura 8. Infecção de neutrófilos com *L. infantum* WT ou deficiente de LPG analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET).** Neutrófilos humanos foram infectados com cepa Ba262 de *L. infantum* WT ou  $\Delta lpg1$  (1:10) por 3h. Em seguida, os neutrófilos foram fixados e processados para microscopia eletrônica de transmissão e fotografados através do microscópio ZEISS EM-109.

#### 4.6.2 Identificação de Vacúolos Lisossomais em Neutrófilos Humanos Durante a Infecção por *L. infantum* $\Delta lpg1$

A sobrevivência das formas promastigotas de *L. donovani*, logo após a sua entrada em neutrófilos, é associada ao LPG por impedir a fusão de vesículas que resultariam na formação do fagolisossomo (DE MORAIS et al., 2015). Para verificar esta hipótese,



infectamos neutrófilos humanos com parasitos WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 marcados com CFSE, emitindo fluorescência verde. As culturas infectadas foram incubadas com *LysoTracker*, um marcador para compartimento ácido que emite fluorescência vermelha. Após 3 horas, a co-localização de *LysoTracker* com o parasito apenas pôde ser notada em neutrófilos infectados com *L. infantum*  $\Delta lpg1$  (Figura 9A), indicando que a formação de vacúolos parasitóforos ácidos ocorreu nessas culturas. Esse resultado converge à infecção de neutrófilos com *L. donovani* deficiente em LPG (GUEIRARD et al., 2008), o que reforça o papel do LPG como molécula essencial para a sobrevivência das formas promastigotas durante as primeiras horas de infecção.



**Figura 9. Redução da viabilidade da *L. infantum*  $\Delta lpg1$  devido à formação de vacúolos parasitóforos ácidos em neutrófilos.** (A) Neutrófilos humanos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 marcados com Carboxifluoresceína Succinimidil Éster (CFSE) na cor verde, incubados com *LysoTracker* (marcador do compartimento lisossomal) em vermelho e com DAPI (marcação nuclear) em azul. Após 3 horas, a co-localização de *LysoTracker* apenas com o parasito  $\Delta lpg1$  foi observada através do microscópio de fluorescência – dado representativo. (B) Para o ensaio com o *Wortmannin*, inibidor de PI3-Kinase, os neutrófilos foram tratados por 30min e depois infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 (1:10). Após 3h, o sobrenadante foi substituído por meio HOMEM e depois de 24h foi realizada a contagem de promastigotas viáveis liberadas no sobrenadante. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Mann-Whitney (\*,  $p < 0,05$ ). #  $p < 0,05$  indica diferença significativa quando comparado ao grupo (WT).

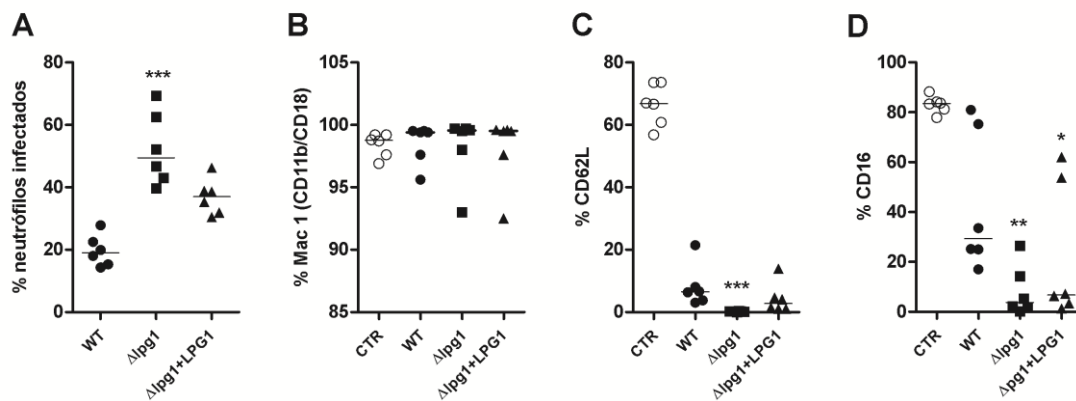
Para complementar o que foi demonstrado na Figura 9A, resolvemos usar o *Wortmannin*, um inibidor da liberação de lisozimas nos fagossomos. Pudemos notar que ao inibir a formação de fagolisossomos em neutrófilos infectados com as formas  $\Delta lpg1$ , há um aumento significativo na sobrevivência desses parasitos em comparação ao mesmo grupo que não foi tratado com *Wortmannin* (Figura 9B). Isso sugere, que a viabilidade da *L. infantum*  $\Delta lpg1$  pode ser comprometida pela formação de vacúolos parasitóforos ácidos. Entretanto, a sobrevivência de *Leishmanias* que possuem o LPG de superfície, WT ou  $\Delta lpg1$ +LPG1, não foi alterada em neutrófilos tratados com o inibidor (Figura 9B).

#### 4.6.3 Avaliação do Perfil de Ativação de Neutrófilos Humanos Infectados com *L. infantum* WT, $\Delta lpg1$ ou $\Delta lpg1$ +LPG1

Diversos trabalhos mostram o LPG envolvido na ativação celular (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012). A ausência do LPG na superfície da *L. infantum* poderia conduzir uma entrada silenciosa no neutrófilo, contribuindo para viabilidade do parasito nesta célula. A partir desta hipótese, após 3h de infecção dos neutrófilos com as formas *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 analisamos a atividade neutrofílica através da expressão de moléculas de superfície, liberação de enzimas dos grânulos e estresse oxidativo.

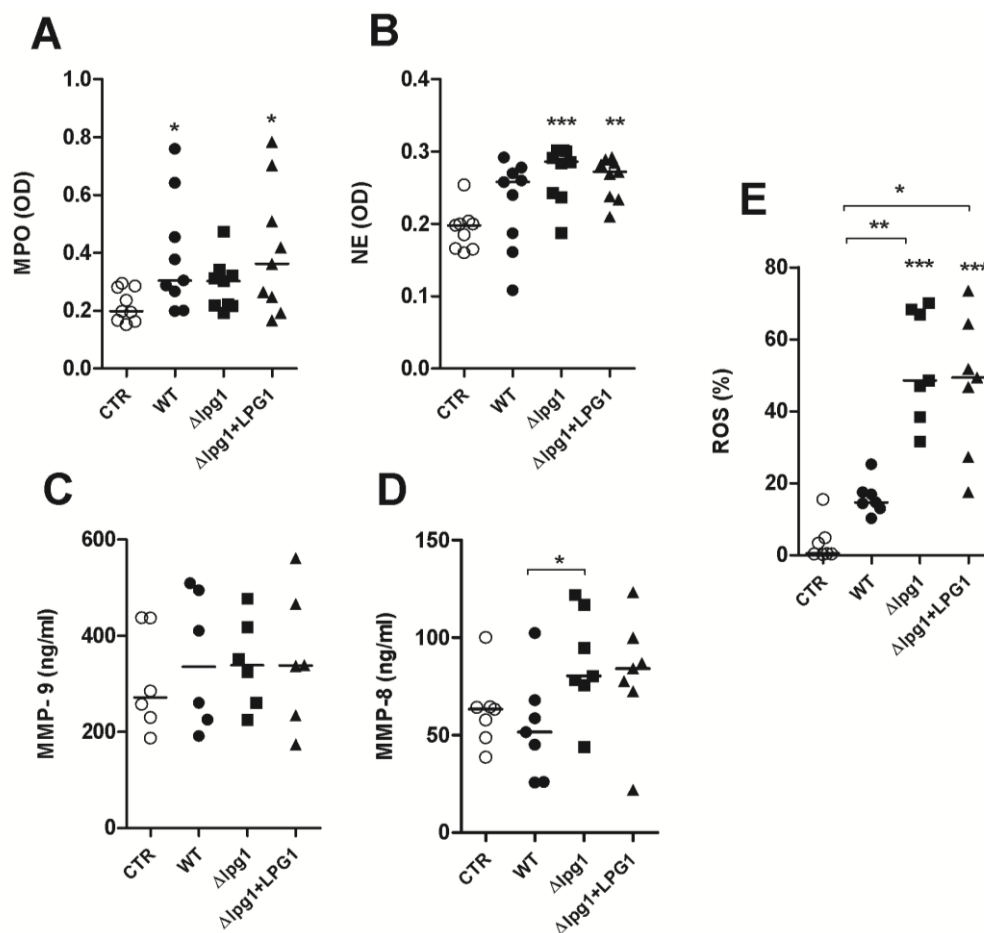
Os neutrófilos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 marcadas com CFSE, emitindo fluorescência verde. Após 3h de infecção, os neutrófilos infectados com as *Leishmanias* fluorescentes, foram marcados com anticorpos CD11b, CD18, CD62-L e CD16 e a frequência de células expressando estes marcadores de superfície foi obtida por citometria de fluxo. O percentual de infecção foi correspondente ao observado em microscopia de luz, evidenciando maior taxa de infecção dos parasitos  $\Delta lpg1$  (Figura 10A). A frequência da expressão de marcadores de superfície foi comparada entre neutrófilos não infectados e neutrófilos infectados com as formas WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1. A expressão do CD11b/CD18, componentes do MAC-1, foi aumentada em todos neutrófilos, não infectados ou infectados. Por outro lado, somente a infecção dos neutrófilos com parasitos  $\Delta lpg1$  reduziu à expressão de CD62-L e CD16 em relação ao grupo controle de neutrófilos não infectados (Figura 10B – 10D). A expressão de

marcadores de superfície não foi estatisticamente significativa entre os neutrófilos infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1.



**Figura 10. A infecção por *L. infantum*  $\Delta lpg1$  modula a expressão de marcadores de superfície em neutrófilos humanos.** Neutrófilos humanos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 (1:10) por 3 horas. A taxa de infecção de neutrófilos por *Leishmanias* fluorescentes (A) foi obtida por citometria de fluxo. A expressão dos marcadores de superfície CD11b/CD18 (B), CD62-L (C) e CD16 (D) também foi avaliada por citometria de fluxo entre neutrófilos não infectados e infectados. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (\*,  $p < 0,5$ ) (\*\*,  $p < 0,01$ ) (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

A liberação de enzimas neutrofílicas no sobrenadante dessas culturas foi avaliada por ensaio colorimétrico. A atividade da mieloperoxidase (MPO), da elastase neutrofílica (NE) e a liberação da metaloproteínase 9 (MMP-9) não foram alteradas entre os grupos infectados (Figura 11A - 11C). A atividade da MPO foi aumentada em neutrófilos devido à infecção com as formas WT ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 em comparação aos neutrófilos não infectados do grupo controle (Figura 11A). Entretanto, ainda em relação aos neutrófilos não infectados do grupo controle, a atividade da NE foi modulada positivamente na infecção com *L. infantum*  $\Delta lpg1$  (Figura 11B). A metaloproteínase-8 (MMP-8) foi a única a apresentar um aumento significativo nos neutrófilos infectados por *L. infantum*  $\Delta lpg1$  em relação aos neutrófilos infectados com a forma WT (Figura 11D).



**Figura 11. Ativação dos neutrófilos humanos devido à infecção com *L. infantum*  $\Delta lpg1$ .** Neutrófilos humanos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1+LPG1$  (1:10). Após 3h, a atividade da MPO (A) e NE (B) e a quantificação da MMP-9 (C) e MMP-8 (D) no sobrenadante dessas culturas foram realizadas por ensaio colorimétrico. Para analisar a produção de ROS, a infecção foi de 1h. Após esse período, os neutrófilos foram incubados com a sonda *dihydroethidium* (DHE) e a análise feita por citometria de fluxo (E). Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (\*,  $p < 0,05$ ) (\*\*,  $p < 0,01$ ) (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

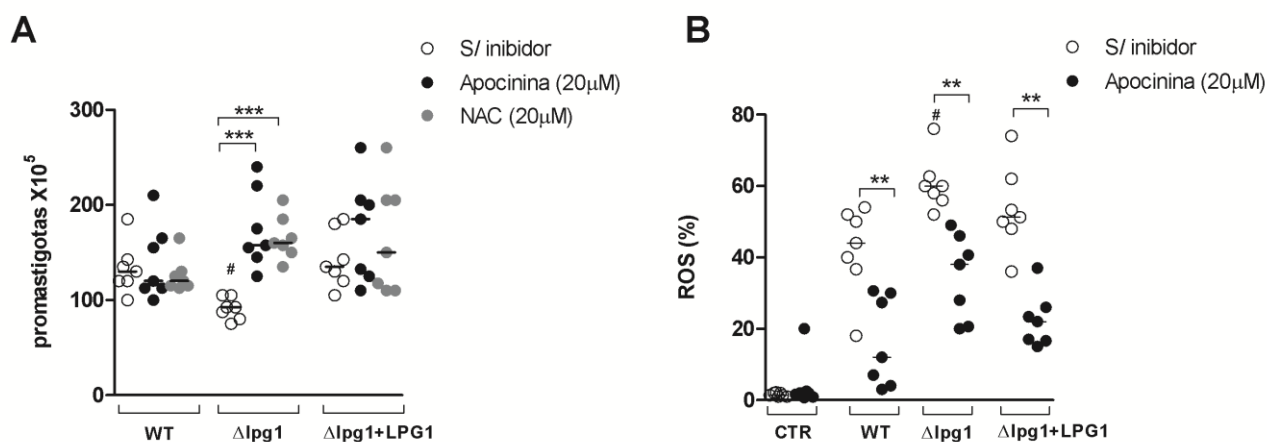
A atividade oxidativa também foi avaliada. Para isso, após 1h de infecção dos neutrófilos com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1+LPG1$ , incubamos essas células com uma sonda que reage em contato com íons superóxidos. A análise por citometria de fluxo revelou um aumento significativo de ROS durante a infecção com os parasitos  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1+LPG1$  em relação ao grupo não tratado e aquele infectado com a forma WT (Figura 11E). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são conhecidas como importantes agentes

leishmanicidas, o que pode contribuir para controlar a replicação das formas  $\Delta lpg1$ , principalmente, devido à ausência de LPG na sua superfície como uma barreira proteção.

#### 4.6.4 Modulação da Resposta Oxidativa para o Controle da Infecção de *L. infantum* $\Delta lpg1$ em Neutrófilos Humanos

A partir do conjunto de dados obtidos anteriormente, pudemos correlacionar o aumento da resposta oxidativa (Figura 11E) com a susceptibilidade dos parasitos que não possuem LPG de superfície, uma vez que é uma resposta associada à maturação do fagolisossomo. Essa hipótese foi sustentada ao utilizarmos Apocinina ou N-Acetilcisteína (NAC), moléculas antioxidantes, nas culturas de neutrófilos infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1. Seguente às 3h de infecção, os sobrenadantes dessas culturas foram substituídos por meio HOMEM e após 24h, os promatigostas viáveis liberados dos neutrófilos foram contabilizados. Quando a infecção dos neutrófilos com *L. infantum*  $\Delta lpg1$  ocorreu em presença dos inibidores da NADPH, a contagem dos parasitos viáveis foi superior ao do mesmo grupo infectado sem os inibidores (Figura 12A). Além disso, com a inibição da NADPH a viabilidade dos parasitos  $\Delta lpg1$  foi semelhante à das formas selvagens. A sobrevivência de *Leishmanias* WT ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 não foi modulada devido ao tratamento com os inibidores (Figura 12A).

Dados publicados por Lodge e colaboradores (2006) mostraram que na infecção de macrófagos por *L. donovani*, as formas selvagens do parasito, mas não as deficientes em LPG, interferem na montagem do complexo NADPH oxidase e, conseqüentemente, impedem a geração de superóxido (LODGE; DIALLO; DESCOTEAUX, 2006). Esses dados corroboram com o fato da inibição da NADPH permitir a sobrevivência da *L. infantum* que não tem o LPG dentro dos neutrófilos, o que não é observado na ausência do tratamento (Figura 12A).



**Figura 12. O pré-tratamento de neutrófilos com Apocinina favorece a sobrevivência de *L. infantum*  $\Delta$ lpg1 por redução de ROS.** (A) Neutrófilos humanos foram incubados com Apocinina (20  $\mu$ M) ou N-Acetilcisteína (NAC) (20  $\mu$ M) por 1h e então, estimulados ou não com promastigotas de *L. infantum* WT,  $\Delta$ lpg1 ou  $\Delta$ lpg1+LPG1 (1:10) por 3h. Após a estimulação, o meio foi substituído por meio HOMEM (meio de cultura de *Leishmania*) e as promastigotas viáveis liberadas no sobrenadante dessas culturas foram contadas 24 horas após a troca do meio. (B) Para analisar a produção de ROS, a inibição com Apocinina (20  $\mu$ M) foi por 1h, seguida por 30min de infecção com *L. infantum* WT,  $\Delta$ lpg1 ou  $\Delta$ lpg1+LPG1 (1:10). Após esse período, os neutrófilos foram incubados com a sonda *dihydroethidium* (DHE) e a análise feita por citometria de fluxo. Cada ponto no gráfico representa um doador e as barras representam a mediana. Em A, asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (\*,  $p < 0,05$ ). (\*\*\*,  $p < 0,001$ ). Em B, asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Mann-Whitney (\*\*,  $p < 0,01$ ). #  $p < 0,05$  indica diferença significativa quando comparado ao grupo (WT).

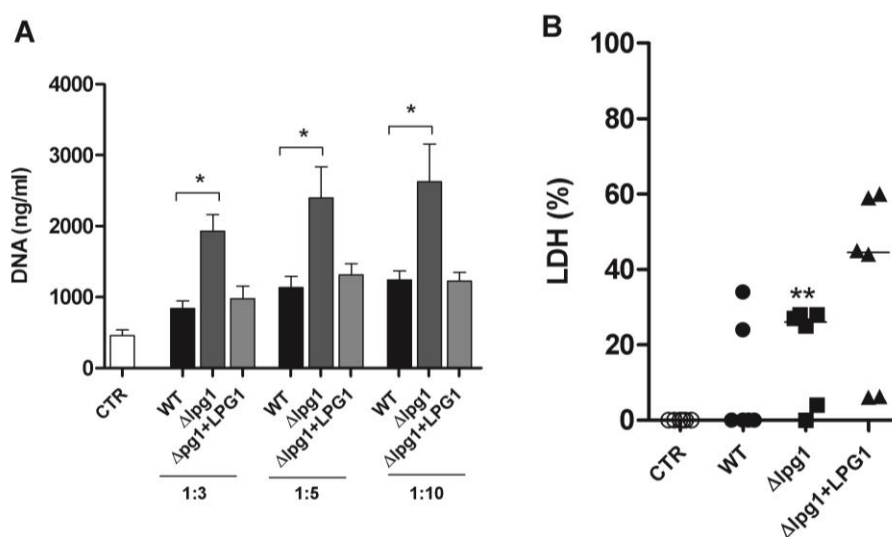
Em paralelo ao ensaio anterior, analisamos a produção de ROS nos neutrófilos infectados por *L. infantum* WT,  $\Delta$ lpg1 ou  $\Delta$ lpg1+LPG1, em presença da Apocinina. O tratamento com Apocinina reduziu de modo significativo a resposta oxidativa em todos os grupos de neutrófilos infectados (Figura 12B) em comparação aos respectivos grupos sem o tratamento com o inibidor. Esse resultado complementa o ensaio de viabilidade (Figura 12A), ratificando a produção de ROS nos neutrófilos como mecanismo de morte para *L. infantum*  $\Delta$ lpg1.

#### 4.6.5 Efeito do LPG de Superfície da *L. infantum* na Integridade dos Neutrófilos Infectados

Na infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, a viabilidade da célula hospedeira tem interferido diretamente na viabilidade do parasito. Em células apoptóticas, moléculas anti-inflamatórias como o PGE<sub>2</sub> e o fator transformante do

crescimento (TGF-B), propiciam um microambiente favorável à *Leishmania* (PRATES et al., 2012; SALEI et al., 2017). Enquanto que em células necróticas, a produção de ROS, atua para o controle da infecção pelo parasito (AFONSO et al., 2008).

Com o objetivo de identificar a presença de neutrófilos danificados durante a interação com LPG de *L. infantum*, quantificamos a liberação de DNA e LDH, como indícios de dano na membrana celular. Neutrófilos humanos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  e  $\Delta lpg1$ +LPG1 em diferentes proporções neutrófilo: parasito (1:3, 1:5 e 1:10). Após 3h, analisamos a presença de DNA no sobrenadante dessas culturas por PicoGreen (ensaio colorimétrico). Pudemos observar que a infecção por parasitos  $\Delta lpg1$  induziu a uma liberação maior de DNA em neutrófilos em relação à infecção com as formas que possuem o LPG na superfície, WT e  $\Delta lpg1$ +LPG1 (Figura 13A).



**Figura 13. Dano celular em neutrófilos infectados com *L. infantum*  $\Delta lpg1$ .** (A) Neutrófilos humanos foram infectados com *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 (1:3, 1:5 ou 1:10) por 3h. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados e a presença de DNA extracelular foi detectado por PicoGreen. (B) Após 3h de infecção de neutrófilos humanos *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 (1:10), a liberação de LDH das células danificadas foi mensurada no sobrenadante por ensaio colorimétrico. Asterisco indica diferença significativa pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (\*,  $p < 0,05$ ) (\*\*,  $p < 0,01$ ).

Posteriormente, associamos a presença indireta de neutrófilos danificados à liberação da enzima citosólica LDH. Em 3h, houve um aumento de LDH no sobrenadante dos neutrófilos infectados com *L. infantum*  $\Delta lpg1$ , enquanto que a infecção dos neutrófilos por *L. infantum* WT e  $\Delta lpg1$ +LPG1 não mostrou aumento significativo da enzima (Figura 13B).

Notamos somente na infecção por *L. infantum*  $\Delta lpg1$  uma maior liberação de DNA e LDH para o meio extracelular devido à perda da integridade na membrana plasmática dos neutrófilos. Essa alteração estrutural nesses neutrófilos são indícios de uma morte inflamatória, culminando juntamente na morte da *Leishmania* sem o LPG. O mesmo não aconteceu durante a infecção dos neutrófilos com *L. infantum* WT ou  $\Delta lpg1$ +LPG1, uma vez que a presença do LPG na membrana dos parasitos conduziu a alguma via para a sua sobrevivência.

Nos dados explanados anteriormente, como visto em outros trabalhos, os parasitos geneticamente restituídos -  $\Delta lpg1$ +LPG1 parecem não ter recuperado totalmente a virulência (SPATH et al., 2000), além de terem uma regulação inadequada do gene reconstituído (SPATH et al., 2003). Isso fez com que apresentassem resultados que oscilam semelhança tanto com a forma selvagem - WT como com a deficiente em LPG -  $\Delta lpg1$ .



## 5. DISCUSSÃO

Para entender a persistência da *Leishmania* durante a infecção é necessário avaliar a resposta imune do hospedeiro e fatores genéticos do parasito. Na Leishmaniose Visceral a presença do parasito ocasiona diversos distúrbios a nível sistêmico, tais como: sangramento, neutropenia e baixa de plaquetas (SAMPAIO et al., 2010). A molécula conhecida como heme está presente em doenças caracterizadas por hemólise ou dano celular extensivo e conduz a diversas alterações celulares (LOBODA et al., 2016). Na LV, a presença do heme livre (FARIAS LUZ et al., 2016) pode influenciar o perfil de ativação de neutrófilos com implicações na sobrevivência do parasito.

Inicialmente, investigando dados oriundos do soro de pacientes com LV, os níveis de heme tiveram uma correlação positiva com HO-1, uma enzima capaz de degradar o heme (OTTERBEIN; FORESTI; MOTTERLINI, 2016) e o LDH, um marcador de hemólise e dano tecidual (KATO; NOURAI; GLADWIN, 2013), respectivamente. Em relação aos leucócitos, os níveis séricos de heme foram correlacionados de forma negativa com a contagem de neutrófilos no sangue periférico. Cerca de 52% desses pacientes tinham altos níveis de heme e neutropenia, condição que está presente em apenas 4% dos indivíduos saudáveis. Os neutrófilos, além de serem importantes em tempos iniciais da doença (PRATES et al., 2012), no contexto da neutropenia em pacientes graves, este aspecto clínico favorece o estabelecimento de co-infecções (AL-GHAZALY et al., 2017). Juntos estes dados apontam para um papel central do heme na ativação de mecanismos inflamatórios e de dano tecidual associados a neutrófilos na LV humana.

Considerando que em pacientes com LV, os níveis de heme estão relacionados à redução de neutrófilos, nos concentramos em investigar essa condição *in vitro*. Os dados da citometria de fluxo mostraram que na presença do heme a maior parte dos neutrófilos infectados estava apoptótica e um percentual menor encontrava-se em apoptose tardia/necrose. Esses resultados estão de acordo com a literatura, que demonstra o heme induzindo a morte de neutrófilos por liberação das NETs (CHEN et al., 2014) e morte programada em macrófagos por necroptose (FORTES et al., 2012). Importante observar que a infecção por *L. infantum* não induziu um efeito sinérgico na morte celular de neutrófilos em presença do heme.

A presença do heme não só provocou uma redução da sobrevivência dos neutrófilos infectados, como também fez com que essas células apresentassem um perfil inflamatório com produção de ROS e maiores níveis de MMP-9, MPO e NE. Embora este seja um importante mecanismo microbicida em neutrófilos ativados, o acúmulo de ROS pode causar graves lesões celulares. Muitas vias de sinalização relacionadas ao estresse oxidativo e produção de ROS conduzem para a morte celular (LOBODA et al., 2016). Em nossos resultados, existe a possibilidade do heme ter liberado seu átomo de ferro central, que ao atuar como um reator de Fenton gerou radicais hidroxilas ( $\text{OH}^\cdot$ ) capazes de modular a morte celular. Esse efeito foi comprovado em estudos anteriores, onde o uso de quelantes de ferro reduziu a produção de  $\text{OH}^\cdot$  e, conseqüentemente, reverteu a apoptose de neutrófilos (ROLLET-LABELLE et al., 1998).

Apesar dessas condições desfavoráveis, surpreendentemente, a viabilidade de *L. infantum* em neutrófilos humanos não foi prejudicada, uma vez que a presença do heme modulou positivamente o crescimento das formas promastigotas em comparação ao grupo não tratado. O crescimento da *Leishmania* em neutrófilos ativados indica uma estratégia de resistência do parasito que poderia ser favorecida pela redução da sobrevivência da célula hospedeira. Outros modelos experimentais evidenciaram que o estresse oxidativo também favoreceu a viabilidade e replicação de distintos microrganismos (FORTES et al., 2012; WEINLICH et al., 2017).

Entre os mecanismos que podem facilitar a sobrevivência do parasito dentro dos neutrófilos envolve a via do ferro. O ferro é um fator essencial para diversas atividades enzimáticas e processos biológicos, indispensável para o crescimento de microrganismos. Em determinadas circunstâncias, a baixa disponibilidade de ferro, impõe o desenvolvimento de estratégias para facilitar o seu armazenamento. Entre estas estratégias, podemos citar o transporte de heme ou heme-proteínas por terem o ferro em sua composição. O grupo de Norma Andrews descreveu a existência de uma proteína transmembrana transportadora de heme em formas amastigotas de *L. amazonensis* (HUYNH et al., 2012). É possível que durante a infecção dos neutrófilos, o heme tenha sido degradado pela enzima HO-1, liberando seu átomo de ferro. Desse modo, a *L. infantum* utilizaria a sua NADPH redutase para converter  $\text{Fe}^{+3}$  em  $\text{Fe}^{+2}$ , permitindo a internalização do metal (WILSON et al., 2002).

Nas nossas culturas, o  $\text{Fe}^{+2}$  e o heme favoreceram a replicação do parasito, mas conduziram respostas distintas em relação a atividade das enzimas neutrofilicas. Diferente do que observamos em presença do heme, o uso do  $\text{Fe}^{+2}$  não modulou as atividades das enzimas MPO e NE em neutrófilos infectados por *L. infantum*, sugerindo que este metal possua um papel mais nutricional do que indutor de ativação da célula hospedeira.

Em um cenário inflamatório, antioxidantes neutralizam os efeitos nocivos dos radicais livres. A SOD é uma importante defesa antioxidante, por decompor o superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (FUKAI ;USHIO-FUKAI, 2011). O superóxido é um conhecido agente microbicida e ao ser catalisado pela SOD, pode proporcionar proteção ao patógeno. Em macrófagos humanos infectados por *L. amazonensis*, a SOD-1 favoreceu a infecção ao reduzir a formação do íon superóxido intracelular (KHOURI et al., 2009). Nos nossos ensaios, a infecção, somente em presença do heme e do  $\text{Fe}^{+2}$ , aumentou a atividade da SOD-1. O fato de termos também acúmulo de ROS nas mesmas condições experimentais associadas à indução da SOD-1, sugere que a resposta antioxidante foi insuficiente para reverter o estresse oxidativo nas culturas de neutrófilos infectados.

Além da SOD-1, a HO-1 é outro antioxidante importante implicado na patogênese da Leishmaniose. Trabalhos anteriores do grupo mostraram que a indução de HO-1 em macrófagos infectados com *L. infantum* favorece a persistência dos parasitos (LUZ et al., 2012). Nos ensaios *in vitro*, neutrófilos infectados demonstraram que o ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para HO-1 foi expresso apenas na presença de heme, sem ter alteração no tratamento com  $\text{Fe}^{+2}$ . Importante notar que a ação antioxidante da HO-1 também tem um papel relevante na LV humana, uma vez que os níveis séricos desta enzima se correlacionam positivamente com os níveis de heme livre, sugerindo um controle dos efeitos deletérios desta molécula na doença sistêmica.

O conjunto dos resultados apontados até aqui contribui para novas interpretações acerca de estratégias de resistência da *Leishmania* para manter a infecção em ambientes inflamatórios.

O desfecho da infecção por *Leishmania* tem implicações conhecidamente multifatoriais. Dentro do cenário da interação parasito-hospedeiro é possível que o parasito utilize fatores de virulência para driblar mecanismos de ativação de vias inflamatórias. Neste sentido, o lipofosfoglicano (LPG), glicoconjugado mais abundante na

superfície de promastigotas de *Leishmania*, possui um papel central para a sobrevivência do parasito (DE MORAIS et al., 2015).

Neste estudo, testamos se a viabilidade intracelular da *Leishmania* após a entrada em neutrófilos depende do LPG. Recentemente nosso grupo produziu *L. infantum* deficiente em LPG1 (LÁZARO-SOUZA et al., 2018) como ferramenta biológica, fundamental, para elucidar a importância do LPG da *L. infantum* nos momentos iniciais da interface *Leishmania*-neutrófilo, decisivos para o desenvolvimento da doença.

Em ensaios *in vitro*, as formas de *L. infantum* deficientes em LPG –  $\Delta lpg1$  infectaram mais neutrófilos, embora tenham sobrevivido menos. Comparado a esse grupo, as formas *L. infantum* com o LPG de superfície – WT (selvagem) e  $\Delta lpg1$ +LPG1 (parasitos que tiveram o gene do LPG1 restituído), apresentaram uma menor taxa de infecção, porém com maior viabilidade intracelular do parasito. Alguns estudos demonstraram que a internalização de promastigotas de *L. donovani* do tipo selvagem é realmente menor quando comparada a de promastigotas sem o LPG (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997). Assim, o LPG parece interferir no processo de fagocitose, contribuindo para uma entrada silenciosa da *Leishmania*, com maiores chances de sobreviver, o que não acontece quando o LPG está ausente na superfície das promastigotas.

Para a sobrevivência intracelular, muitos patógenos tentam escapar da ação de moléculas microbicidas presentes em vesículas das células fagocíticas. Nos macrófagos, bactérias como *Mycobacterium tuberculosis* ou protozoários como *Toxoplasma* e *Leishmania*, resistem, muitas vezes, ao impedir formação do fagolisossomo (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012; FORRELLAD et al., 2013). Nós analisamos se após neutrófilos humanos internalizarem a *L. infantum* seria possível identificar a formação de vacúolos parasitóforos ácidos. Observamos que somente na infecção por *L. infantum*  $\Delta lpg1$  houve co-localização do marcador para compartimento ácido (*Lysotracker*) com o vacúolo parasitóforo contendo parasito, condizente com dados prévios da literatura (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997; DERMINE et al., 2000; GUEIRARD et al., 2008). Dessa forma, podemos inferir que temos mais promastigotas WT e  $\Delta lpg1$ +LPG1 viáveis dentro dos neutrófilos por não ocorrer formação de vacúolos ácidos com o parasito, reforçando o papel protetor do LPG.

Em corroboração ao ensaio anterior, o uso do *Wortmannin*, inibidor da movimentação de vesículas, durante a infecção, reverteu à marcação intracelular de vacúolos ácidos em neutrófilos infectados por *L. infantum*  $\Delta lpg1$  (dados não mostrados). Além disso, o *Wortmannin* permitiu também reverter à mortalidade da *L. infantum*  $\Delta lpg1$  nos neutrófilos humanos, com taxa de replicação similar ao de *L. infantum* WT e  $\Delta lpg1$ +LPG1. Todos estes achados indicam que a presença do LPG nas formas selvagens de *Leishmania* confere ao parasito a capacidade de modular o microambiente do vacúolo parasitóforo a favor da infecção.

Nossos dados apoiam observações prévias quanto à infecção de neutrófilos por *L. donovani* deficiente de LPG, onde esses parasitos estavam presentes em maior quantidade nos compartimentos lisossomais em comparação ao grupo infectado com *L. donovani* selvagem (GUEIRARD et al., 2008). Uma das possíveis consequências deste mecanismo de escape é que esses neutrófilos contendo *Leishmanias* viáveis em compartimentos não líticos possam entrar em apoptose e serem fagocitados silenciosamente por macrófagos (LASKAY et al., 2003; GUEIRARD et al., 2008).

Dados publicados por Vinet e colaboradores (2009), mostraram que após a fagocitose da *L. donovani* pelo macrófago, o LPG é transferido do parasito para a membrana do macrófago. Essa inserção do LPG na membrana do macrófago reduz a capacidade fagocitária da célula hospedeira (VINET et al., 2009) e impede o recrutamento da ATPase para o vacúolo e, conseqüentemente, sua acidificação, criando um meio intracelular hospitaleiro para a *Leishmania* (VINET et al., 2011). Embora a entrada dos parasitos selvagens seja reduzida, sua sobrevivência é compensada por não haver acidificação do fagossomo. Isso pode representar uma adaptação bem sucedida da *Leishmania* não só em macrófagos, mas também em neutrófilos, como foi demonstrado nos nossos ensaios.

Além de impedir a formação de fagolisossomo, alguns trabalhos mostram o LPG modulando a resposta inflamatória. O isolado de LPG ao se ligar, principalmente, a TLR-2 e TLR-4, ativam a fosforilação de proteínas da família das MAP quinases e a sinalização do Factor Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), com produção de citocinas pró-inflamatórias (TAVARES et al., 2014; ROJAS-BERNABÉ et al., 2014; LIMA et al., 2017). Em publicações do nosso grupo, a utilização do LPG purificado de *L. infantum* levou a produção de HO-1 em macrófagos murinos (LUZ et al., 2012) e em outra ocasião, o mesmo isolado ativou a via PPAR- $\gamma$  com a

liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandina E<sub>2</sub> e óxido nítrico (LIMA et al., 2017).

Os neutrófilos são responsivos a lesão e infecção, inicialmente, a partir da sua saída vascular para o tecido. Os neutrófilos que realizam essa migração apresentam um perfil fenotípico ativado, que pode ser referente à expressão de moléculas de superfície (BARDOEL et al., 2014). No trabalho aqui apresentado, analisamos indiretamente o processo de migração dos neutrófilos humanos em resposta ao LPG na superfície da *L. infantum* WT e  $\Delta lpg1$ +LPG1 e a ausência do LPG na *L. infantum*  $\Delta lpg1$ . A expressão de CD11b/CD18 foi aumentada em todos os grupos, mesmo aqueles que não foram infectados. A ativação de células não infectadas já foi identificada em células dendríticas de camundongos (CARVALHO et al., 2008) e em neutrófilos humanos (TAVARES et al., 2014). O aumento da expressão de MAC-1 (composta pelas moléculas CD11b e CD18) é relacionada a adesão celular ao endotélio e também ao reconhecimento e internalização de formas promastigotas da *Leishmania* (LAUFS et al., 2002).

Além da expressão do CD11b/CD18, notamos que as moléculas de superfície CD62-L e CD16 foram menos expressas nos neutrófilos infectados, sem diferença significativa devido à presença ou não do LPG na superfície dos parasitos. Dados na literatura sugerem que o receptor CD16 pode ser internalizado ao iniciar o processo de fagocitose, ocasionando assim sua redução na superfície celular. Quando neutrófilos são ativados, também há a clivagem de CD62-L, diminuindo sua expressão (FUTOSI;FODOR; MOCSAI, 2013). Resposta semelhante foi encontrada em neutrófilos humanos infectados com *L. amazonensis* (TAVARES et al., 2014), indicando que a infecção por espécies diferentes de *Leishmania* induzem ativação migratória dos neutrófilos. Este fenômeno, provavelmente, foi mediado por uma via que independe da interação com LPG da *Leishmania*, mas pode envolver outras moléculas do seu glicocálix, como o gp63 (DE MORAIS et al., 2015).

Após a análise fenotípica dos neutrófilos pela expressão dos referidos marcadores de superfície, nós investigamos a ativação dos mecanismos microbicidas destas células através da liberação das enzimas neutrofílicas e da produção de ROS.

Ao observarmos a dinâmica dos grânulos neutrofílicos, à atividade da NE teve um aumento significativo nos neutrófilos infectados com *L. infantum*  $\Delta lpg1$  em relação aos neutrófilos não infectados. Presente nos grânulos específicos, a MMP-8, também



mostrou resultado significativo. A MMP-8 foi à única enzima aumentada devido à infecção dos neutrófilos com *L. infantum*  $\Delta$ *lpg1* comparada à infecção com a forma selvagem, *L. infantum* WT. Em estudos anteriores, as formas promastigotas selvagens das espécies *L. major* e *L. donovani* sobreviveram em neutrófilos humanos por serem capazes de prevenir a fusão precoce de grânulos específicos e terciários com o vacúolo contendo o parasito (MOLLINEDO et al., 2010). No nosso estudo, a utilização anterior do *Wortmannin*, ao inibir os mecanismos de fusão dependente de PI3-Kinase, afetou também a movimentação do citoesqueleto intracelular, incluindo o extravasamento do conteúdo dos grânulos neutrofílicos. Ao evitar a liberação da NE, MMP-8 e enzimas lisossomais o vacúolo fagocítico no interior do neutrófilo se tornaria propício para permanência da *L. infantum*  $\Delta$ *lpg1*.

O status de ativação de neutrófilos é associado diretamente a sua capacidade de gerar estresse oxidativo. Assim como outras espécies de *Leishmania* são capazes de induzir ou potencializar a explosão respiratória nos neutrófilos (LAUFS et al., 2002; CARLSEN et al., 2015), as formas promastigotas de *L. infantum* promoveram o aumento de ROS em neutrófilos independente da presença do LPG de superfície. Entretanto, as formas deficientes em LPG induziram um aumento expressivo de ROS em comparação aos grupos de neutrófilos não infectados ou infectados com WT.

Como publicado pelo nosso grupo, a redução na sobrevivência da *L. infantum*  $\Delta$ *lpg1* em macrófagos de camundongos pode estar relacionada a níveis mais altos de iNOS dependente de NF- $\kappa$ B, responsável pela geração de óxido nítrico (LÁZARO-SOUZA et al., 2018). Ainda em macrófagos, a presença do LPG já foi associada à redução dos níveis de superóxido por prejudicar a montagem do complexo NADPH (LODGE;DIALLO; DESCOTEAUX, 2006). A incubação de neutrófilos com LPG de *L. major* também diminuiu o estresse oxidativo, promovendo a persistência do parasito nessas células (MOLLINEDO et al., 2010; SALEI et al., 2017). A resposta oxidativa poderia contribuir para o controle da carga parasitária nos nossos neutrófilos infectados com promastigotas de *L. infantum*  $\Delta$ *lpg1*, principalmente, por essas formas não apresentarem LPG na sua superfície como uma barreira proteção.

O LPG da *Leishmania* inibe a maturação dos vacúolos nos quais elas são internalizadas ao bloquear a inserção da v-ATPase (VINET et al., 2009) e a montagem da NADPH oxidase (LODGE;DIALLO; DESCOTEAUX, 2006). Desse modo, o interior do

fagossomo não é acidificado e é desprovido de oxidantes. A *L. infantum*  $\Delta lpg1$ , por não ter o LPG, não impede essa maturação fagossômica, causando uma explosão respiratória nos neutrófilos que pôde ser revertida na utilização de inibidores da NADPH oxidase. Nas nossas culturas, o uso de Apocinina ou NAC durante a infecção dos neutrófilos, diminuiu a produção de ROS, sendo capaz de subverter a mortalidade da *L. infantum*  $\Delta lpg1$  nessas células. Já foi estabelecido que as interações LPG-TLR são responsáveis pela modulação de ROS em macrófagos durante a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* (IBRAIM et al., 2013). Entretanto, se tratando da infecção de neutrófilos por *L. infantum*, mais investigações são necessária para elicitar à sinalização do LPG para respostas oxidativas.

Além do seu papel central na morte intracelular de patógenos em neutrófilos, mecanismos oxidativos são relacionados a diferentes vias de morte celular. Publicações do nosso grupo demonstraram o envolvimento de ROS na morte celular por necroptose no contexto da Leishmaniose Visceral (FARIAS LUZ et al., 2016; BARBOSA et al., 2018).

A necroptose é descrita como uma necrose regulada por vias de sinalização específicas, envolvendo especialmente a proteína quinase RIP1K (*kinases receptor interacting protein*) (VAN HERREWEGHE et al., 2010). Indícios de morte inflamatória foram encontrados quando detectamos DNA extracelular e LDH nas culturas de neutrófilos infectados com *L. infantum*  $\Delta lpg1$ , sugerindo a morte da célula hospedeira e do seu parasito. Não detectamos a perda da integridade na membrana plasmática de neutrófilos com *L. infantum* WT ou com *L. infantum*  $\Delta lpg1$ +LPG1. Recentemente, vimos que ao induzir necroptose em neutrófilos infectados com *L. infantum*, há maiores níveis de LDH e ROS, com controle da replicação parasitária (BARBOSA et al., 2018). No atual trabalho, esse cenário condiz com os resultados da interação dos neutrófilos com *L. infantum*  $\Delta lpg1$ , sugerindo mais uma circunstância em que o LPG é de importância vital para a *Leishmania*. Todavia, inibidores específicos da via da necroptose não afetaram distintamente as infecções por parasitos selvagens ou deficientes para o LPG (dados não mostrados). Assim, moléculas associadas à via de necroptose devem ser exploradas futuramente para obtermos um resultado mais preciso.

Alguns trabalhos mostram uma contra regulação da via de necroptótica quando a via autofágica está ativada (FRANK et al., 2019). A autofagia é uma atividade em que a célula engloba e degrada porções do seu citoplasma. Embora seja um processo fisiológico, a autofagia pode ocorrer em situações de estresse, como no caso de infecções

celulares (KLIONSKY et al., 2011). A maquinaria da autofagia pode propiciar a reciclagem de macromoléculas que seriam utilizadas como nutrientes, tanto pela célula hospedeira como pelo parasito (CYRINO et al., 2012).

Durante a infecção dos neutrófilos, a presença do LPG nas promastigotas de *L. infantum* WT ou  $\Delta lpg1$ +LPG1 modularia a autofagia em benefício à viabilidade do parasito. A autofagia já foi detectada em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (DIAS et al., 2018) e a inibição da via resultou em uma menor quantidade de parasitos intracelulares (CYRINO et al., 2012). O grupo do Descoteaux também identificou a autofagia como via de sobrevivência para *L. donovani* em neutrófilos humanos e o uso do parasito mutante para o LPG não induziu autofagia, indicando que o LPG medeia essa interação com os neutrófilos (PITALE et al., 2019). Tentativas de manipulação da via autofágica, seja com indutores ou inibidores específicos, não mostraram diferença nas infecções por parasitos selvagens ou deficientes para o LPG (dados não mostrados). Contudo, precisamos investigar outros mecanismos de morte celular implicados no nosso modelo de estudo.

## 6. CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados aqui apresentados evidenciam o papel dos neutrófilos durante o percurso da LV, sofrendo influência do heme ao contribuir para o processo inflamatório e favorecendo a persistência do parasito, enquanto que a interação dos neutrófilos com o LPG de superfície da *Leishmania* reforça o papel da molécula como fator de virulência e uma barreira de proteção associada a mecanismos de escape da resposta oxidativa da célula hospedeira.

## REFERÊNCIAS

ABDELMOULA, M. S. *et al.* Pulmonary aspergillosis in a child with chronic granulomatous disease. **Tunis Med.**, v. 81, n. 10, p. 815-820, 2003.

AFONSO, L. *et al.* Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J. Leukoc. Biol.**, v. 84, n. 2, p. 389-396, 2008.

AL-GHAZALY, J. *et al.* Hematological characteristics of yemeni adults and children with visceral leishmaniasis. could eosinopenia be a suspicion index? **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. e2017056, 2017.

BARBOSA, G. G. A. *et al.* Is there a relationship between the neutrophil/lymphocyte ratio and bilaterality in patients with coxarthrosis? **Rev. Bras. Ortop.**, v. 53, n. 6, p. 778-782, 2018.

BARDOEL, B. W. *et al.* The balancing act of neutrophils. **Cell Host. Microbe.**, v. 15, n. 5, p. 526-536, 2014.

BECKER, I. *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 130, n. 2, p. 65-74, 2003.

BELIC, A. *et al.* Hematologic characteristics of leishmaniasis. **Med. Pregl.**, v. 53, n. 1-2, p. 89-91, 2000.

BOAVENTURA, V. S. *et al.* Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, n. 10, p. 2830-2836, 2010.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de leishmaniose visceral por regiões brasileiras, 2006 a 2015**. 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf>. Acesso em: 1 out 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral**. Brasília: MS, 2006.

BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.

BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. M. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. **Parasitol Today**, v. 12, n. 11, p. 444-447, 1996.

BUTCHER, B. A. *et al.* Deficiency in beta1,3-galactosyltransferase of a *Leishmania* major lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*-sand fly interaction. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 34, p. 20573-20579, 1996.

CARLSEN, E. D. *et al.* Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 182, n. 2, p. 109-118, 2015.

CARVALHO, L. O. *et al.* *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: experimental cutaneous leishmaniasis associated with systemic amyloidosis in mice. **Exp. Parasitol.**, v. 120, n. 1, p. 123-125, 2008.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHARMOY, M. *et al.* The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, p. 719361, 2010.

CHEN, G. *et al.* Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3818-3827, 2014.

COELHO-FINAMORE, J. M. *et al.* *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. **Int. J. Parasitol.**, v. 41, n. 3-4, p. 333-442, 2011.

CULLEY, F. J. *et al.* C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. **J. Immunol.**, v. 156, n. 12, p. 4691-4696, 1996.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

CUNNINGTON, A. J. *et al.* Prolonged neutrophil dysfunction after *Plasmodium falciparum* malaria is related to hemolysis and heme oxygenase-1 induction. **J. Immunol.**, v. 189, n. 11, p. 5336-5346, 2012.



CYRINO, L. T. *et al.* In vivo and in vitro *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. **Tissue Cell**, v. 44, n. 6, p. 401-408, 2012.

DABOUL, M. W. Role of neutrophils in cutaneous leishmaniasis. **East Mediterr. Health J.**, v. 16, n. 10, p. 1055-1058, 2010.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-945, 2008.

DE MORAIS, C. G. *et al.* The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **Biomed. Res .Int.**, v. 2015, p. 324915, 2015.

DERMINE, J. F. *et al.* *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. **Cell Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 115-126, 2000.

DESCOTEAUX, A.; MATLASHEWSKI, G.; TURCO, S. J. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. **J. Immunol.**, v. 149, n. 9, p. 3008-3015, 1992.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1455, n. 2-3, p. 341-352, 1999.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 12, p. 2061-2068, 1997.

DEY, S. *et al.* Impact of intravascular hemolysis in malaria on liver dysfunction: involvement of hepatic free heme overload, NF-kappaB activation, and neutrophil infiltration. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 32, p. 26630-26646, 2012.

DIAS, B. R. S. *et al.* Autophagic Induction Greatly Enhances *Leishmania* major Intracellular Survival Compared to *Leishmania amazonensis* in CBA/j-Infected Macrophages. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 1890, 2018.

DUTRA, F. F.; BOZZA, M. T. Heme on innate immunity and inflammation. **Front. Pharmacol.**, v. 5, p. 115, 2014.

FARIAS LUZ, N. *et al.* RIPK1 and PGAM5 Control *Leishmania* Replication through Distinct Mechanisms. **J. Immunol.**, v. 196, n. 12, p. 5056-5063, 2016.

FORRELLAD, M. A. *et al.* Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3-66, 2013.

FORTES, G. B. *et al.* Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. **Blood**, v. 119, n. 10, p. 2368-2375, 2012.

FRANK, D. *et al.* Activated MLKL attenuates autophagy following its translocation to intracellular membranes. **J. Cell Sci.**, v. 132, n. 5, 2019.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MOCSAI, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **Int. Immunopharmacol.**, v. 17, n. 4, p. 1185-1197, 2013.

GABRIEL, C. *et al.* Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **J. Immunol.**, v. 185, n. 7, p. 4319-4327, 2010.

GEORGIADOU, S. P. *et al.* Current clinical, laboratory, and treatment outcome characteristics of visceral leishmaniasis: results from a seven-year retrospective study in Greece. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 34, p. 46-50, 2015.

GIORGIONE, J. R.; TURCO, S. J.; EPAND, R. M. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from Leishmania donovani. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, n. 21, p. 11634-11639, 1996.

GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 50, p. 323-354, 2010.

GOZZELINO, R.; SOARES, M. P. Coupling heme and iron metabolism via ferritin H chain. **Antioxid Redox Signal.**, v. 20, n. 11, p. 1754-1769, 2014.

GRACA-SOUZA, A. V. *et al.* Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. **Blood**, v. 99, n. 11, p. 4160-4165, 2002.

GUEIRARD, P. *et al.* Trafficking of Leishmania donovani promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cell. Microbiol.**, v. 10, n. 1, p. 100-111, 2008.

GUIMARAES-COSTA, A. B. *et al.* Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 106, n. 16, p. 6748-6753, 2009.

HOLM, A. *et al.* Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC $\alpha$  and defective phagosome maturation. **Cell. Microbiol.**, v. 3, n. 7, p. 439-447, 2001.

HUYNH, C. *et al.* Heme uptake by Leishmania amazonensis is mediated by the transmembrane protein LHR1. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 7, p. e1002795, 2012.

IBRAIM, I. C. *et al.* Two biochemically distinct lipophosphoglycans from Leishmania braziliensis and Leishmania infantum trigger different innate immune responses in murine macrophages. **Parasite Vectors**, v. 6, p. 54, 2013.

JOSHI, P. B. *et al.* Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 120, n. 1, p. 33-40, 2002.

KATO, G. J.; NOURAIE, S. M.; GLADWIN, M. T. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 1091-1092, 2013.

KAVOOSI, G. *et al.* Leishmania major lipophosphoglycan: discrepancy in Toll-like receptor signaling. **Exp. Parasitol.**, v. 124, n. 2, p. 214-218, 2010.

KHOURI, R. *et al.* IFN- $\beta$  impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 182, n. 4, p. 2525-2531, 2009.

KLIONSKY, D. J. *et al.* A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). **Autophagy**, v. 7, n. 11, p. 1273-1294, 2011.

KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Front Biosci.**, v. 13, p. 2400-2407, 2008.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

LARSEN, R. *et al.* Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. **Front. Pharmacol.**, v. 3, p. 77, 2012.

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

LAUFS, H. *et al.* Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 2, p. 826-835, 2002.

LAZARO-SOUZA, M. *et al.* *Leishmania infantum* Lipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay. **Front. Microbiol.**, v. 9, p. 626, 2018.

LIMA, G. M. *et al.* The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, v. 64, n. 2-3, p. 145-151, 1998.

LIMA, J. B. *et al.* *Leishmania infantum* lipophosphoglycan induced-Prostaglandin E2 production in association with PPAR-gamma expression via activation of Toll like receptors-1 and 2. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 14321, 2017.

LOBODA, A. *et al.* Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. **Cell Mol Life Sci.**, v. 73, n. 17, p. 3221-3247, 2016.

LODGE, R.; DIALLO, T. O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. **Cell Microbiol.**, v. 8, n. 12, p. 1922-1931, 2006.

LUZ, N. F. *et al.* Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **J Immunol.**, v. 188, n. 9, p. 4460-4467, 2012.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annu Rev Pathol.**, v. 9, p. 181-218, 2014.

MCFARLANE, E. *et al.* Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 2, p. 532-541, 2008.

MOLLINEDO, F. *et al.* Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 45, p. 34528-34536, 2010.

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 2, p. 121, 2012.

NADERER, T.; VINCE, J. E.; MCCONVILLE, M. J. Surface determinants of Leishmania parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Curr. Mol. Med.**, v. 4, n. 6, p. 649-665, 2004.

NOVAIS, F. O. *et al.* Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection. **J. Immunol.**, v. 183, n. 12, p. 8088-8098, 2009.

OTTERBEIN, L. E.; FORESTI, R.; MOTTERLINI, R. Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in the Heart: The Balancing Act Between Danger Signaling and Pro-Survival. **Circ. Res.**, v. 118, n. 12, p. 1940-1959, 2016.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cell Microbiol.**, v. 11, n. 9, p. 1290-1296, 2009.

PHAM, C. T. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 7, p. 541-550, 2006.

PHAM, N. K.; MOURIZ, J.; KIMA, P. E. Leishmania pifanoi amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 12, p. 8322-8333, 2005.

PITALE, D. M. *et al.* Leishmania donovani Induces Autophagy in Human Blood-Derived Neutrophils. **J. Immunol.**, v. 202, n. 4, p. 1163-1175, 2019.

PORTO, B. N. *et al.* Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 33, p. 24430-24446, 2007.

PRATES, D. B. *et al.* New Insights on the Inflammatory Role of Lutzomyia longipalpis Saliva in Leishmaniasis. **J. Parasitol. Res.**, v. 2012, p. 643029, 2012.

PRIVE, C.; DESCOTEAUX, A. Leishmania donovani promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. **Eu.r J. Immunol.**, v. 30, n. 8, p. 2235-2244, 2000.

RIBEIRO-GOMES, F. L. *et al.* Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **J. Immunol.**, v. 179, n. 6, p. 3988-3994, 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L. *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 172, n. 7, p. 4454-4462, 2004.

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

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends Parasitol.**, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

ROCHAEL, N. C. *et al.* Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 18302, 2015.

ROUSSEAU, D. *et al.* In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiol.**, v. 1, p. 17, 2001.

SACRAMENTO, L. A. *et al.* Toll-Like Receptor 2 Is Required for Inflammatory Process Development during *Leishmania infantum* Infection. **Front .Microbiol.**, v. 8, p. 262, 2017.

SALEI, N. *et al.* Enhanced survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes in the presence of apoptotic cells. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0171850, 2017.

SAMPAIO, M. J. *et al.* Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 11, p. e877, 2010.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SOARES, R. P. *et al.* Differential midgut attachment of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* and *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia*. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2010, p. 439174, 2010.

SPATH, G. F. *et al.* Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 97, n. 16, p. 9258-9263, 2000.

SPATH, G. F. *et al.* The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 100, n. 16, p. 9536-9541, 2003.

TAVARES, N. M. *et al.* Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils. **J. Infect. Dis.**, v. 210, n. 4, p. 656-666, 2014.

VAN HERREWEGHE, F. *et al.* Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 67, n. 10, p. 1567-1579, 2010.

VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J. Immunol.**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.

VERCOSA, B. L. *et al.* Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. **Vet. Parasitol.**, v. 189, n. 2-4, p. 162-170, 2012.

VINET, A. F. *et al.* The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 10, p. e1000628, 2009.

VINET, A. F. *et al.* Exclusion of synaptotagmin V at the phagocytic cup by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan results in decreased promastigote internalization. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 9, p. 2619-2628, 2011.

VOLTARELLI, J. C. *et al.* Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in chronic human Chagas' disease. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 32, n. 4, p. 240-248, 1990.

WEINLICH, R. *et al.* Necroptosis in development, inflammation and disease. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 18, n. 2, p. 127-136, 2017.

WELTE, K.; ZEIDLER, C. Severe congenital neutropenia. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 23, n. 2, p. 307-320, 2009.



WHO. The World Health Report Geneva, Switzerland. 2008.

WHO. The World Health Report Geneva, Switzerland. 2015.

WILSON, M. E. *et al.* Leishmania chagasi: uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. **Exp. Parasitol.**, v. 100, n. 3, p. 196-207, 2002.

**ANEXOS**



# Leishmania infantum Lipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Debora Decote-Ricardo,  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro, Brazil

### Reviewed by:

Fabienne Tacchini-Cottier,  
Université de Lausanne, Switzerland  
Leonardo Marques da Fonseca,  
Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, Brazil

### \*Correspondence:

Albert Descoteaux  
albert.descoteaux@iaf.inrs.ca  
Valéria M. Borges  
vborges@bahia.fiocruz.br

†These authors have contributed  
equally to this work.

‡These authors have contributed  
equally to this work and as senior  
author.

### Specialty section:

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

Received: 13 December 2017

Accepted: 19 March 2018

Published: 05 April 2018

### Citation:

Lázaro-Souza M, Matte C, Lima JB,  
Arango Duque G,  
Quintela-Carvalho G, de Carvalho  
Vivarini Á, Moura-Pontes S,  
Figueira CP, Jesus-Santos FH,  
Gazos Lopes U, Farias LP,  
Araújo-Santos T, Descoteaux A and  
Borges VM (2018) *Leishmania*  
*infantum* Lipophosphoglycan-Deficient  
Mutants: A Tool to Study Host  
Cell-Parasite Interplay.  
*Front. Microbiol.* 9:626.  
doi: 10.3389/fmicb.2018.00626

Milena Lázaro-Souza<sup>1,2†</sup>, Christine Matte<sup>3†</sup>, Jonilson B. Lima<sup>4</sup>, Guillermo Arango Duque<sup>3</sup>,  
Grazielle Quintela-Carvalho<sup>1,2,5</sup>, Áislan de Carvalho Vivarini<sup>6</sup>, Sara Moura-Pontes<sup>2</sup>,  
Cláudio P. Figueira<sup>1</sup>, Flávio H. Jesus-Santos<sup>1,2</sup>, Ulisses Gazos Lopes<sup>6</sup>,  
Leonardo P. Farias<sup>1</sup>, Théo Araújo-Santos<sup>4</sup>, Albert Descoteaux<sup>3\*‡</sup> and Valéria M. Borges<sup>1,2\*‡</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Inflammation and Biomarkers, Gonçalo Moniz Institut, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil,

<sup>2</sup>Department of Legal Medicine, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil, <sup>3</sup>Institut National de la Recherche Scientifique  
–Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada, <sup>4</sup>Center of Biological Sciences and Health, Federal University of Western of  
Bahia, Barreiras, Brazil, <sup>5</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano (IFBaiano), Alagoinhas, Brazil,

<sup>6</sup>Laboratory of Molecular Parasitology, Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, Center of Health Science, Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Lipophosphoglycan (LPG) is the major surface glycoconjugate of metacyclic *Leishmania* promastigotes and is associated with virulence in various species of this parasite. Here, we generated a LPG-deficient mutant of *Leishmania infantum*, the foremost etiologic agent of visceral leishmaniasis in Brazil. The *L. infantum* LPG-deficient mutant ( $\Delta lpg1$ ) was obtained by homologous recombination and complemented via episomal expression of *LPG1* ( $\Delta lpg1 + LPG1$ ). Deletion of *LPG1* had no observable effect on parasite morphology or on the presence of subcellular organelles, such as lipid droplets. While both wild-type and add-back parasites reached late phase in axenic cultures, the growth of  $\Delta lpg1$  parasites was delayed. Additionally, the deletion of *LPG1* impaired the outcome of infection in murine bone marrow-derived macrophages. Although no significant differences were observed in parasite load after 4 h of infection, survival of  $\Delta lpg1$  parasites was significantly reduced at 72 h post-infection. Interestingly, *L. infantum* LPG-deficient mutants induced a strong NF- $\kappa$ B-dependent activation of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) promoter compared to wild type and  $\Delta lpg1 + LPG1$  parasites. In conclusion, the *L. infantum*  $\Delta lpg1$  mutant constitutes a powerful tool to investigate the role(s) played by LPG in host cell-parasite interactions.

**Keywords:** Lipophosphoglycan, *Leishmania infantum*, gene targeting, lipid droplets, macrophage

## INTRODUCTION

Lipophosphoglycan (LPG) is one of the most abundant components of *Leishmania* membranes (Turco and Descoteaux, 1992). In the course of parasite interaction with invertebrate hosts, LPG binds to the midgut epithelium of specific species of the sandfly vectors (Sacks et al., 2000), and protects parasites against the digestive enzymes present in the peritrophic matrix following blood feeding (Sacks and Kamhawi, 2001). In vertebrate hosts, LPG contributes to virulence by shielding *Leishmania* against the complement system (Spath et al., 2003) and by inhibiting phagolysosomal



biogenesis (Desjardins and Descoteaux, 1997; Vinet et al., 2009; Moradin and Descoteaux, 2012). Purified LPG has been considered as a pathogen-associated molecular pattern molecule (PAMP) that triggers Toll-like receptors (TLR) and is also known to interfere with pro-inflammatory and signaling pathways in host cells (Descoteaux et al., 1991; Descoteaux and Turco, 1993; Becker et al., 2003; de Veer et al., 2003; Kavooosi et al., 2009; Rojas-Bernabé et al., 2014; Tavares et al., 2014; Lima et al., 2017).

This complex glycolipid is organized in four domains: a conserved 1-O-alkyl-2-lyso-phosphatidyl(myo)inositol membrane anchor, a conserved diphosphoheptasaccharide core structure, a polymer of repeating phosphodisaccharide units (phosphoglycan or PG) carrying species-specific side chains and variable, often mannose-rich cap structures (Turco and Descoteaux, 1992; McConville and Ferguson, 1993). Although the biosynthesis of LPG has attracted considerable interest, to date only few enzymes and transporters involved in this process have been identified either biochemically, genetically, or both (Ryan et al., 1993; Descoteaux et al., 1995, 1998, 2002).

One of the key enzymes in the biosynthesis of LPG is *LPG1*, a putative galactofuranosyl transferase specifically involved in the synthesis of the LPG glycan core (Ryan et al., 1993). Consequently, parasites lacking the *LPG1* gene ( $\Delta lpg1$ ) express a truncated LPG without the PG domain; they nonetheless assemble and secrete other PG-containing molecules (Dermine et al., 2000; Späth et al., 2000). Both *L. major* and *L. donovani* require *LPG1* for the establishment of infection within macrophages, as evidenced by the elimination of *LPG1*-null mutants following phagocytosis; yet, restoration of LPG expression by genetic complementation restored the capacity to replicate within macrophages (Späth et al., 2000; Lodge et al., 2006). Interestingly, phosphoglycan synthesis does not seem to be an absolute requirement for virulence in all *Leishmania* species, since *L. mexicana* phosphoglycan-deficient parasites were found to be similarly virulent to their wild-type (WT) counterparts (Ilg et al., 1999, 2001; Ilg, 2000). This difference in LPG requirement for the establishment of infection within macrophages may be related to the fact that *L. mexicana* resides in large fusogenic communal vacuoles, as opposed to the non-fusogenic, tight individual vacuoles in which *L. major* and *L. donovani* replicate. The role played by *LPG1* in *L. infantum* infectivity in mammals remains to be established.

This report describes the disruption of *LPG1* in *L. infantum*, the main etiological agent of visceral leishmaniasis in Brazil. While deletion of *LPG1* did not alter parasite morphology *in vitro* or the presence of subcellular organelles, e.g., lipid droplets (LD),  $\Delta lpg1$  parasites experienced distinct infection outcomes in comparison to WT parasites. Hence, the *L. infantum* *LPG1*-null strain described in the present study constitutes a powerful tool to investigate the role of LPG in host-parasite interactions.

## METHODS

### Ethics Statement

This study was carried out in accordance with the recommendations of Institutional Review Board for Animal Experimentation (CEUA), Gonçalo Moniz Institute, Fundação

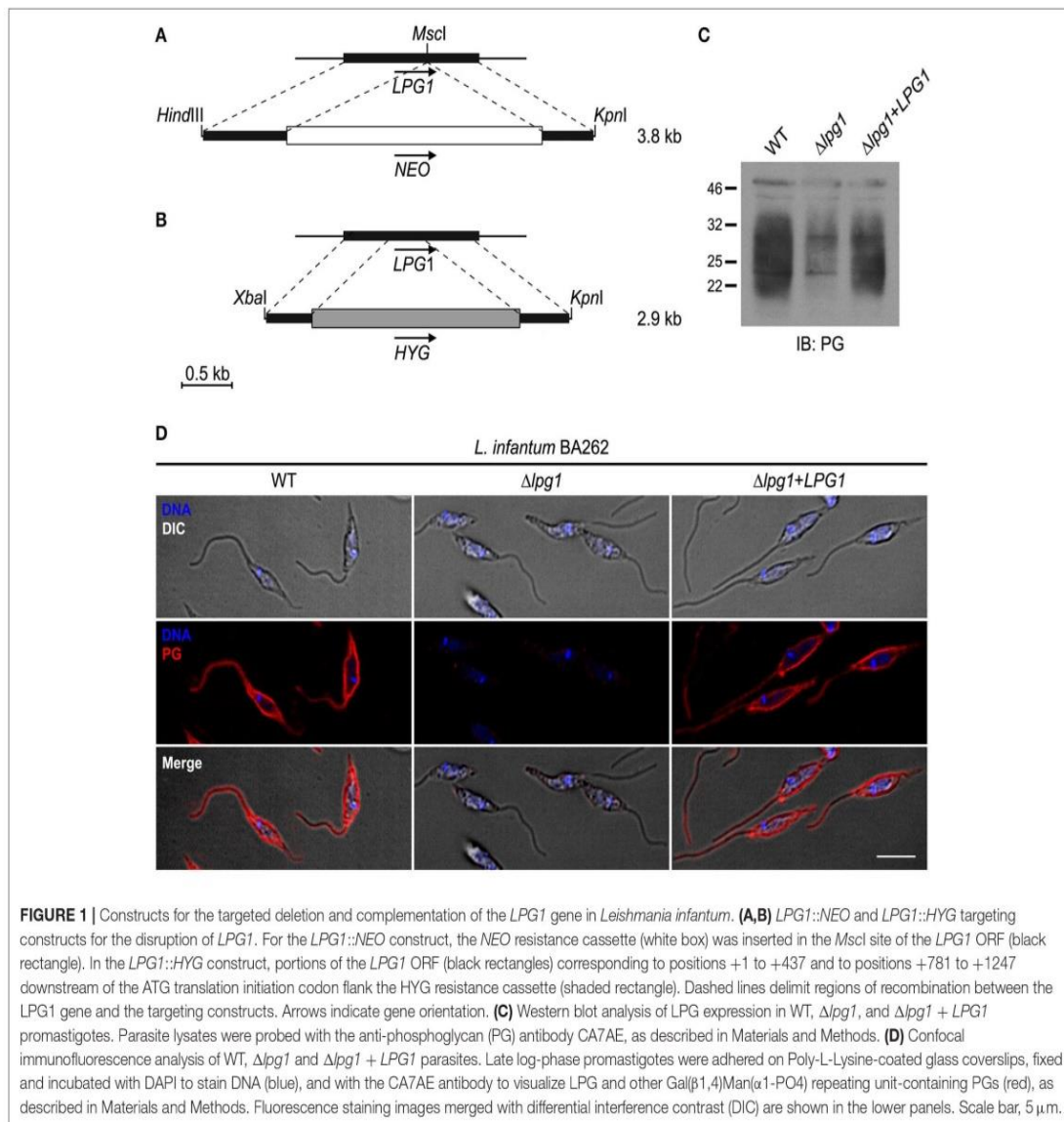
Oswaldo Cruz. The protocol was approved by the Institutional Review Board for Animal Experimentation (CEUA), Gonçalo Moniz Institute, Fundação Oswaldo Cruz (Protocol No. 021/2015).

### Animals

Inbred male C57BL/6 mice, aged 6–8 weeks, were obtained from the animal care facility of the Gonçalo Moniz Institute, Fundação Oswaldo Cruz (IGM-FIOCRUZ, Bahia, Brazil).

### Targeted Deletion of the *LPG1* Gene and Complementation

The constructs for *LPG1* (beta galactofuranosyl transferase) gene targeting were designed based on the *L. infantum* *LPG1* gene sequence (GenBank accession No. GU233511). Homozygous *LPG1*-null mutants ( $\Delta lpg1$ ) were obtained using two targeting constructs (Figures 1A,B). For the *NEO* targeting construct, the entire *LPG1* gene was amplified by PCR from *L. infantum* BH46 (MCAN/BR/89/BH46) DNA using *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs) and oligodeoxynucleotides AD-358 (forward) (5'-gtacaagttccatATGGCGCCGCTCGCTG-3') and AD-359 (reverse) (5'-gctactcgagTTAGCTGGGGTCAACAG-3'). This fragment was digested with *HindIII* and *XhoI*, and then ligated with the *HindIII*-*XhoI*-digested pBluescript II SK<sup>-</sup> vector, yielding pBS-*LPG1*. The *NEO* resistance cassette from pLeishNeo (unpublished) was extracted with *NotI* and *EcoRV*, blunted and inserted in the *MscI* site of pBS-*LPG1*, within the *LPG1* gene, yielding pBS-*LPG1*::*NEO*. For the *HYG* targeting construct, nucleotides 1–437 of the *LPG1* gene were amplified by RT-PCR from *L. infantum* BH46 mRNA using oligodeoxynucleotides AD-53 (forward) (5'-cgggatccatATGGCGCCGCTCGCTG-3') and AD-357 (reverse) (5'-ggaattcTCGGGGTGGTGAATG-3'). This fragment was digested with *BamHI* and *EcoRI*, and then ligated with the *BamHI*-*EcoRI*-digested pBluescript II SK<sup>-</sup> vector. A 467-bp fragment containing nucleotides 781–1,247 of the *LPG1* ORF was amplified by PCR from *L. infantum* BH46 genomic DNA using oligodeoxynucleotides AD-355 (forward) (5'-gcaagcttGGCATCTATTACACAGACCACAAGG-3') and AD-356 (reverse) (5'-caggtcgacTGGCAGCAATGTTTTCACC-3'). This fragment was digested with *HindIII* and *SalI*, then ligated with the same vector, downstream of the first *LPG1* sequence, at the *HindIII* and *SalI* restriction sites. The *HYG* resistance cassette from pX63-HYG was excised with *SalI* and *BamHI*, blunted and inserted between the two *LPG1* sequences, at the *EcoRV* restriction site, yielding pBS-*LPG1*::*HYG*. For genetic complementation of the  $\Delta lpg1$  mutant, the entire *LPG1* ORF was amplified by PCR from *L. infantum* BH46 genomic DNA using Native *Pfu* polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and oligodeoxynucleotides AD-358 (forward) (5'-gtacaagttccatATGGCGCCGCTCGCTG-3') and AD-359 (reverse) (5'-gctactcgagTTAGCTGGGGTCAACAG-3'). This fragment was digested with *HindIII* and *XhoI*, and then ligated with the *HindIII*-*XhoI*-digested pBluescript II SK<sup>-</sup> vector, yielding pBSII-*LPG1*. The absence of mutations in the amplified *LPG1* ORF was verified by Sanger sequencing (Génome Québec; GenBank accession No. GU233511). The *LPG1* gene was then excised from pBSII-*LPG1* with *EcoRV* and *XhoI*, blunted and



ligated with the *EcoRV*-digested pLeishZeo vector (unpublished), yielding pLeishZeo-*LPG1*.

### Transfection and Selection of *L. infantum* $\Delta lpg1$ Promastigotes

Log-phase WT *L. infantum* BA262 (MCAN/BR/89/BA262) promastigotes were first electroporated with the purified *LPG1::HYG* targeting construct (excised as a 2.9-kb *XbaI-KpnI* fragment from pBS-*LPG1::HYG*) using 0.2 cm electroporation cuvettes, at 0.45 kV and a high capacitance of 500  $\mu$ F as previously described (Turco et al., 1994). Following electroporation, promastigotes were incubated for 24 h in drug-free, complete M199 medium and subsequently grown in the presence of 50  $\mu$ g/mL Hygromycin B (Roche Diagnostics). To generate *LPG1*-null mutants, log-phase *lpg1*<sup>+/HYG</sup> heterozygous *L. infantum* BA262 promastigotes were electroporated with

purified *LPG1::NEO* targeting construct (excised as a 3.8-kb *HindIII-KpnI* fragment from pBS-*LPG1::NEO*) and grown after 24 h in the presence of both 50  $\mu$ g/mL Hygromycin B and 70  $\mu$ g/mL G418 (Life Technologies). Absence of LPG in the resulting double drug-resistant  $\Delta lpg1$  promastigotes was verified by Western blot analysis and confocal immunofluorescence. To restore *LPG1* expression, log-phase *L. infantum* BA262  $\Delta lpg1$  cells were electroporated with pLeishZeo-*LPG1*. Complemented mutants ( $\Delta lpg1 + LPG1$ ) were selected with 80  $\mu$ g/mL Zeocin (in addition to G418 and Hygromycin B at concentrations specified above) and verified by Western blotting and confocal immunofluorescence.

### Parasite Cultures

*L. infantum* promastigotes were cultured in HOMEM medium supplemented with 10% inactivated Fetal Bovine Serum (FBS),



100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine in 25 cm<sup>2</sup> flasks at 24°C until late log-phase. For *L. infantum* BA262  $\Delta lpg1$ , Hygromycin (50  $\mu$ g/mL) and G418 (70  $\mu$ g/mL) were added to the medium. For *LPG1*-complemented parasites ( $\Delta lpg1 + LPG1$ ), Hygromycin (50  $\mu$ g/mL), G418 (70  $\mu$ g/mL), and Zeocin (100  $\mu$ g/mL) were added to the medium.

## Western Blotting

Late log-phase promastigotes were washed with ice-cold PBS containing 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, then lysed in 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl and 1% Nonidet P-40, containing complete protease inhibitors (Roche Applied Science) and phosphatase inhibitors (1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mM NaF, 1.5 mM EGTA and 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Samples were sonicated briefly, and insoluble material was removed by centrifugation for 10 min at 4°C. Protein concentrations were determined using the Pierce BCA protein assay kit (Pierce). Proteins were separated by SDS-PAGE and then transferred to Hybond-LFP PVDF membranes (GE Healthcare Life Sciences) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell apparatus (BioRad). Membranes were blocked with 5% BSA and incubated with the mouse monoclonal antibody CA7AE (MediMabs). For immunodetection, goat anti-mouse IgM Heavy Chain Secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP), and enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagents from GE Healthcare Life Sciences were used.

## Confocal Immunofluorescence Microscopy

Late log-phase promastigotes were adhered on Poly-L-Lysine-coated glass coverslips (BD Biosciences, San Jose, CA) by centrifugation, fixed with 4% paraformaldehyde (Canemco and Marivac) for 20 min and simultaneously blocked and permeabilized with a solution of 0.1% Triton X-100, 1% BSA, 6% non-fat dry milk, 20% goat serum and 50% FBS for 20 min. The distribution of LPG and other PGs containing the Gal( $\beta$ 1,4)Man( $\alpha$ 1-PO<sub>4</sub>) repeating unit epitope was visualized using the mouse monoclonal antibody CA7AE (MediMabs, 1:2,000) after 2 h incubation followed by Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgM (Molecular Probes) at 1:500 for 30 min incubation. Parasite nuclei were stained with DAPI (Molecular Probes) at 1:17,000. All steps were performed at room temperature. Coverslips were then mounted in Fluoromount-G (Interscience) and sealed with nail polish. Promastigotes were observed with a Plan APOCHROMAT 63x oil-immersion DIC 1.4 NA objective on a Zeiss LSM780 confocal microscope equipped with a 30 mW 405 nm diode laser, 25 mW 458/488/514 argon multiline laser, 20 mW DPSS 561 nm laser and 5 mW HeNe 633 nm laser, coupled to a Zeiss Axio Observer Z1. Images were acquired in plane scanning mode, and were minimally and equally processed using Carl Zeiss ZEN 2011 software.

## Electron Microscopy

Late log-phase promastigotes were fixed with 2% paraformaldehyde plus 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) overnight at 4°C. Next, parasites were processed

for Transmission Electron Microscopy (TEM) by post-fixing in 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) plus 0.8% potassium ferricyanide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, then dehydrated in acetone at increasing concentrations of 50, 70, 90, and 100% followed by processing for resin embedding (PolyBed 812, Polysciences). Sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids and viewed under a TEM microscope (JEOL JEM-1230). Alternatively, parasites were processed for Scanning Electron Microscopy (SEM) by first fixing as described above, then adhered on Poly-L-Lysine-coated glass coverslips and post-fixed as described above. Samples were then submitted to critical point-drying under CO<sub>2</sub>, coated with a 20 nm-layer of gold particles and examined under SEM (JSM-6390LV, JEOL).

## Parasite Growth Curves

Early log-phase promastigotes ( $1 \times 10^5$ /ml) were cultured and the number of viable promastigotes was determined by daily direct counting performed in a Neubauer chamber.

## Lipid Droplets Staining and Quantification

Late log-phase promastigotes were fixed with 3.7% formaldehyde and stained with osmium tetroxide. Cell morphology was observed, and LD were counted by light microscopy using a 100X objective lens in 50 consecutively scanned parasites (Araújo-Santos et al., 2014).

## Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM) Macrophage and Infection

Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained from C57BL/6 mice as previously described. Briefly, cells were collected from femurs and differentiated in RPMI 1640, 20% inactivated FBS, 30% L929 cell-conditioned media (LCCM), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL Penicillin, and 100  $\mu$ g/mL Streptomycin at 36°C under 5% CO<sub>2</sub>. BMDMs were collected after 7 days and seeded on tissue culture plates in RPMI 1640 medium, 10% inactivated FBS, 5% LCCM and 2 mM L-glutamine (Araújo-Santos et al., 2014).

Cells ( $2 \times 10^5$ ) adhered on coverslips were infected with either WT,  $\Delta lpg1$ , or  $\Delta lpg1 + LPG1$  parasites at a 10:1 multiplicity of infection (MOI). After 4 or 72 h of infection, coverslips were fixed and stained with DiffQuik (Wright-Giemsa). Intracellular parasites were counted under light microscopy to determine the infection index under each experimental condition (Araújo-Santos et al., 2014).

## RAW 264.7 Cell Line, Culture, and Infection

The mouse macrophage leukemia cell line RAW 264.7 (TIB-71; American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) was maintained in DMEM medium with high glucose (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin in an incubator at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. RAW 264.7 cells were infected with either WT,  $\Delta lpg1$  or  $\Delta lpg1 + LPG1$  parasites at a 10:1 multiplicity of infection (MOI). After 4 or 8 h of infection, cells were processed



for quantitative RT-PCR. For the luciferase reporter assay, cultures were washed 2 h post-infection and analyzed 24 h later.

### RNA Extraction and RT-qPCR

For real time quantitative polymerase chain reaction analysis, total RNA of control and infected RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells) was extracted using an Invitrap<sup>®</sup> Spin Cell RNA mini kit (STRACTEC Molecular GmbH, Berlin, Germany). RNA extracts (2  $\mu$ g) were reverse transcribed into first-strand cDNA with ImProm-II (Promega) and oligo(dT) primers in accordance with manufacturer instructions. The following primer DNA sequences were used to determine iNOS mRNA levels: Forward 5'-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3' and Reverse: 5'-CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG-3', while GAPDH mRNA levels were quantified using: Forward 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' and Reverse 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'. Amplicon specificity was carefully verified by the presence of a single melting temperature peak in dissociation curves calculated following RT-qPCR, which was performed via the Applied Biosystems StepOne<sup>™</sup> detection system (Applied Biosystems) using GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Promega Corp., Madison, WI, USA). All RT-qPCR analyses were performed in triplicate. RT-qPCR data was normalized using GAPDH primers as an endogenous control. All gene expression ratios were calculated by the  $\Delta\Delta$ Ct method using StepOne software version 2.0 (Applied Biosystems).

### Transient Transfections and Luciferase Assays

To investigate NF- $\kappa$ B transcriptional activity, RAW 264.7 were plated in 48-well polystyrene plates ( $1 \times 10^5$  cells per well) and transfected with 1  $\mu$ g of the p6kB-Luc luciferase reporter construct (kindly provided by Dr. Patrick Baeuerle, Munich University) in the presence of LIPOFECTAMINE 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). pTK-3XNS luciferase reporter construct was used to measure iNOS promoter activity, provided by Dr. David Geller (University of Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Luciferase activity was normalized using 40 ng of pRL-CMV plasmid (Promega Corp., Madison, WI, USA). Transfected cells were infected with either WT,  $\Delta$ lpg1 or  $\Delta$ lpg1+LPG1 parasites at a 10:1 MOI. After 24 h of infection, cells were washed with PBS, lysed according to the Dual Luciferase System protocol (Promega Corp.), and analyzed in a GloMax<sup>®</sup>-Multi detection system (Promega Corp.). Positive controls consisting of cells stimulated with 1  $\mu$ g/mL of LPS (Sigma-Aldrich) were used to induce the activation of iNOS gene expression.

### Statistical Analysis

BMDM and RAW 264.7 cell infection assays were performed in triplicate, and each experiment was repeated at least three times. Data are presented as the mean and SE (standard error) of representative experiments, and GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software) was used for data analysis.

Means from different groups were compared by One-way ANOVA and comparisons between two groups were performed using the Student Newman-Keuls post-test. Differences were considered statistically significant when  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### Generation of a *L. infantum* Lpg1-Null $\Delta$ lpg1 Mutant

To generate a *L. infantum* LPG-defective ( $\Delta$ lpg1) mutant, WT *L. infantum* BA262 promastigotes were transfected with the LPG1 targeting constructs (Figures 1A,B). The resulting HYG- and NEO-resistant  $\Delta$ lpg1 parasites were transfected with a LPG1 expression vector to generate add-back LPG-expressing parasites ( $\Delta$ lpg1 + LPG1). Loss of LPG expression in the  $\Delta$ lpg1, was determined by comparing LPG levels in WT,  $\Delta$ lpg1, and  $\Delta$ lpg1 + LPG1 *L. infantum* promastigotes by Western blot and by confocal immunofluorescence microscopy (Figures 1C,D). Together, these data indicate that the LPG1 gene was successfully deleted in the  $\Delta$ lpg1 mutants, resulting in the generation of a LPG-defective *L. infantum* mutant.

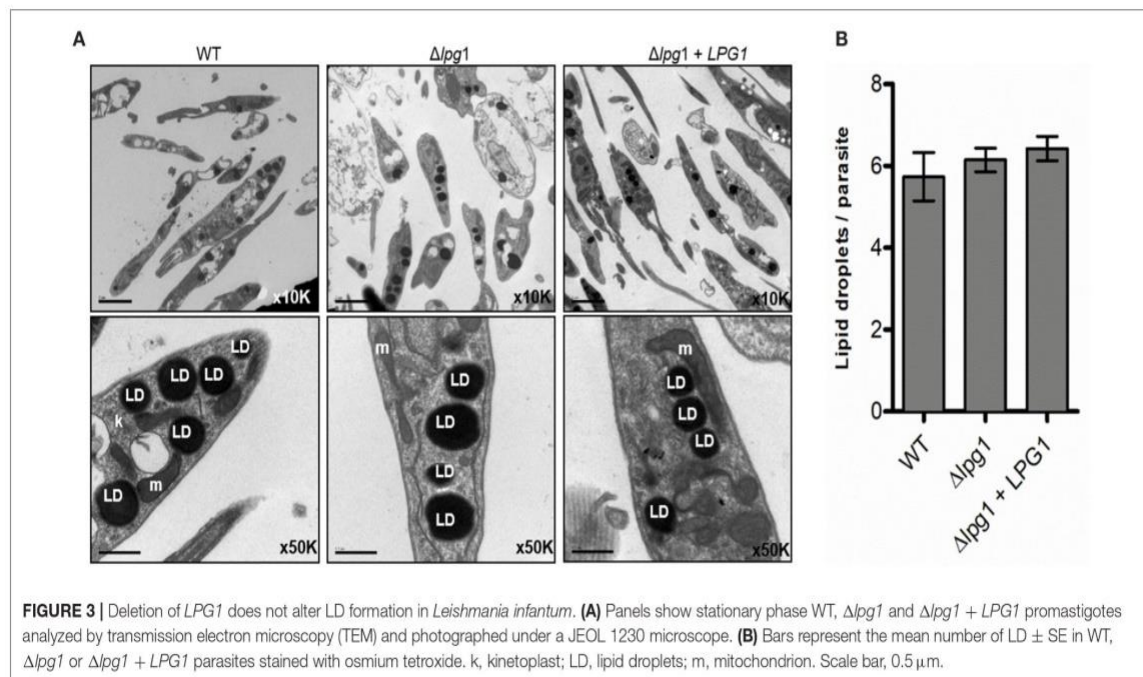
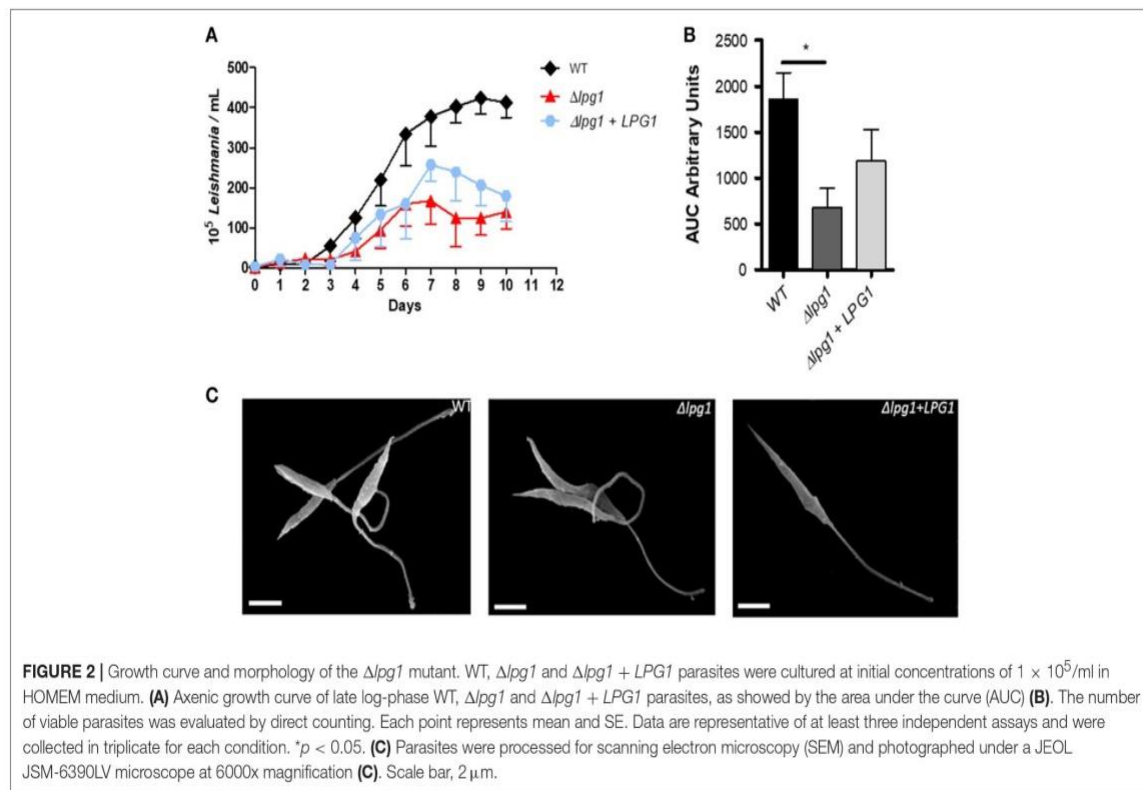
### LPG1-Null Mutants Retain *L. infantum* Viability and Morphology

To determine the effect of deleting LPG1 on parasite growth and morphology, axenic cultures of the three isolates were monitored and counted daily for 10 days until reaching late log phase. A delayed replication capability of the  $\Delta$ lpg1 mutant parasites was noted in comparison to the WT and  $\Delta$ lpg1 + LPG1 parasites (Figure 2A). Wild-type *L. infantum* presented regular growth for 7 days until reaching stationary phase, with a cell density of approximately  $3-4 \times 10^7$  parasites/ml, while the  $\Delta$ lpg1 mutant reached the same phase approximately 3 days later, with a cell density of  $1-2 \times 10^7$  parasites/ml (Figure 2A). The  $\Delta$ lpg1 + LPG1 mutants presented an intermediate growth profile, reaching stationary phase shortly after the WT parasites. Area Under the Curve (AUC) analysis of the growth curve revealed a significant difference only when comparing WT and  $\Delta$ lpg1 parasites ( $p < 0.05$ ), yet no differences were observed between WT and  $\Delta$ lpg1 + LPG1 mutants (Figure 2B). Upon reaching stationary phase, parasites were examined by electron microscopy to assess the presence of morphological alterations. Under both SEM and TEM, no alterations in morphology (Figure 2C) or in ultrastructural characteristics (Figure 3A) were detected among WT,  $\Delta$ lpg1, and  $\Delta$ lpg1 + LPG1 promastigotes. In addition, the absence of LPG1 had no impact on the number of lipid bodies present within the parasites (Figure 3A). Hence, whereas the LPG1 gene had a limited impact on *L. infantum* promastigotes proliferation, it did not significantly alter morphological features of these parasites (Figure 3).

### Lpg1-Null Mutants Exhibit Limited Survival in Macrophages

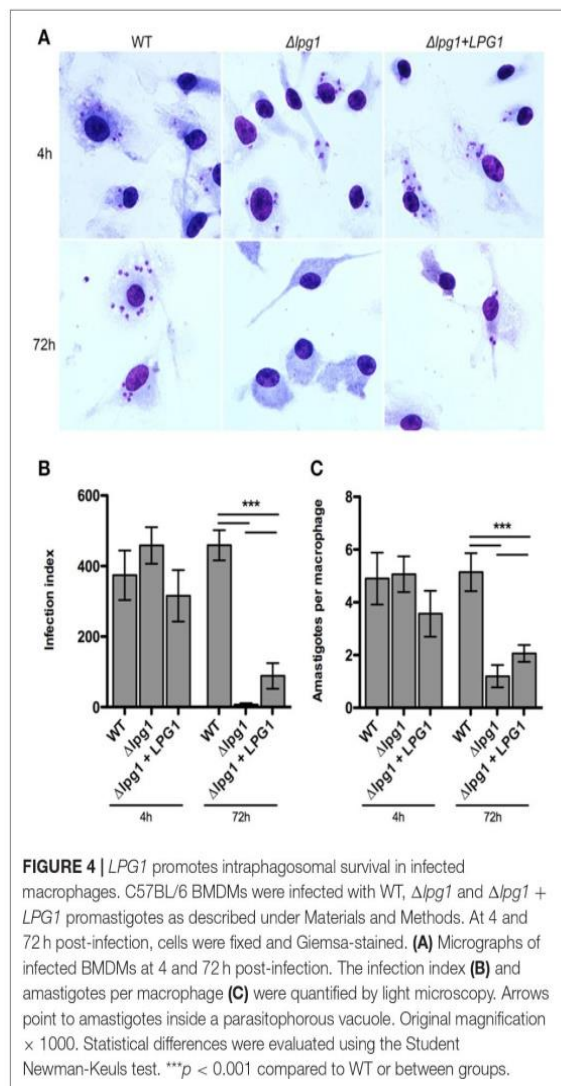
To evaluate differences in parasite survival among WT and transgenic parasites *in vitro*, BMDMs were infected for 4 or





72 h. No differences were observed between the *Leishmania* parasites after 4 h of infection (Figure 4). However, at 72 h post-infection, WT parasites survived more efficiently than the  $\Delta lpg1$  mutant. Expression of *LPG1* in the  $\Delta lpg1$  mutant partially

restored its capacity to survive and replicate within macrophages. These data reinforce the importance of *LPG* as a virulence factor in the successful maintenance of *Leishmania infantum* infection.



### ***LPG1*-Null Mutants Induce NF- $\kappa$ B-Dependent iNOS Expression in Macrophages**

To assess the impact of LPG on the expression of inducible nitric oxide synthase by host cells, we first analyzed iNOS transcript levels in RAW 264.7 cells infected with WT or transgenic parasites. The  $\Delta lpg1$  mutant induced a robust (3.5-fold increase) expression of iNOS compared to WT and  $\Delta lpg1 + LPG1$  promastigotes (**Figure 5A**). We next performed luciferase reporter assays to characterize the modulation of the iNOS promoter by *L. infantum* promastigotes. RAW 264.7 cells were transiently transfected with either the iNOS promoter reporter construct pTK-3XNS or the NF- $\kappa$ B consensus luciferase reporter construct (p $\kappa$ B-Luc) prior to infection with either *L. infantum* WT,  $\Delta lpg1$  or  $\Delta lpg1 + LPG1$ , or stimulation with LPS. As shown in **Figures 5B,C**, *LPG1*-deficient promastigotes induced stronger activation of the iNOS promoter and of the NF- $\kappa$ B reporter. Collectively, these findings indicate that *LPG* contributes to the evasion of iNOS expression by *L. infantum* promastigotes.

## **DISCUSSION**

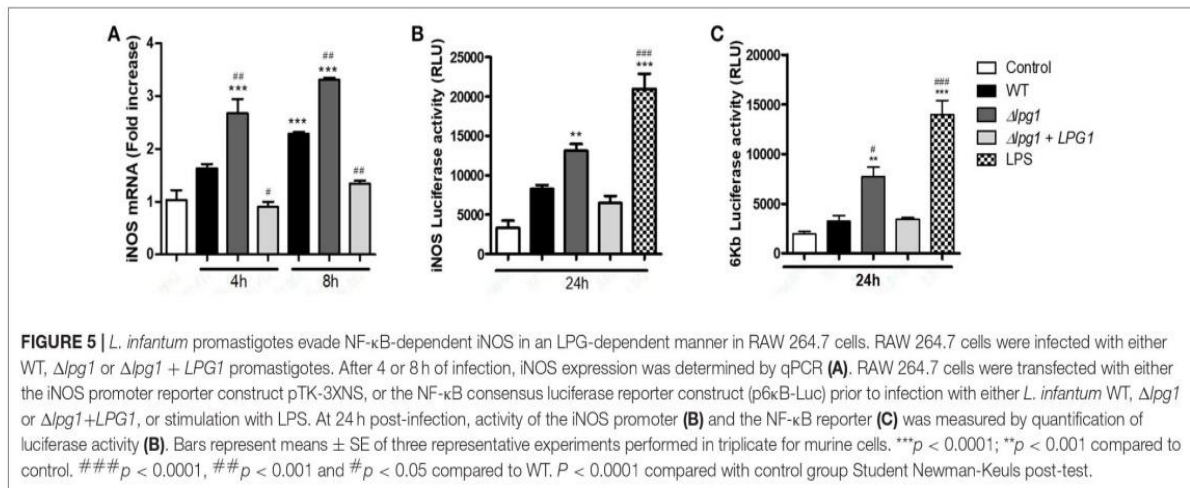
Previous studies using purified LPG were important to unravel its impact on the activation of the immune system. Although purified LPG from different species can activate the release of inflammatory mediators, understanding the role of this response in the context of infection remains a challenge. While some groups have characterized Old World *LPG1*-defective *Leishmania* species, the behavior of these parasites when compared to their WT counterparts varies depending on the species under study (Spath et al., 2003; Capul et al., 2007; Forestier et al., 2014). Here, we generated for the first time a *LPG*-deficient mutant of *L. infantum*, a New World species cluster.

A comparison of parasite growth between axenic cultures containing each of the three isolates showed that the deletion of *LPG1* resulted in a delayed capability of the  $\Delta lpg1$  mutant parasites to replicate in comparison to cultures of WT and  $\Delta lpg1 + LPG1$  parasites. While the deletion of the *LPG1* gene had a limited impact on *L. infantum* promastigote proliferation, no significant morphological or ultrastructural alterations were seen in these parasites, indicating that targeting the *LPG1* gene does not interfere with the intrinsic cell biology of *L. infantum*.

Recently, we have demonstrated that intact LPG from *L. infantum* promastigotes, but not its glycan and lipid moieties, induced a range of pro-inflammatory responses, including prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and nitric oxide (NO) release, increased LD formation, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 expression (Lima et al., 2017). Consequently, a limitation of using purified LPG is that the physiological conditions present in host cell-parasite interactions are not accurately replicated. LDs are key cytoplasmic organelles involved in production of lipid mediators and pro-inflammatory cytokines in mammalian cells (Bozza et al., 2011). Several intracellular pathogens, including *Leishmania*, take advantage of LD formation in host cells (Rabhi et al., 2016). Moreover, LDs have also been described in trypanosomatids in association with arachidonic acid metabolism (Araújo-Santos et al., 2014). Our group previously reported an increase in LD formation during *L. infantum* metacyclogenesis, as well as in the intracellular amastigote form (Araújo-Santos et al., 2014). Here, we showed that the absence of the *LPG1* gene in *L. infantum* did not alter the biogenesis of LDs. In addition, our previous findings showed that parasite-derived PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  produced inside LDs plays a critical role during macrophage infection (Araújo-Santos et al., 2014). We fully intend to comprehensively investigate the potential influence of *LPG1* on the release of PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  in infected macrophages using this novel *L. infantum*  $\Delta lpg1$  mutant.

In *L. major* and *L. donovani*, the specific loss of *LPG* through the ablation of *LPG1* galactofuranosyl transferase strongly impairs the ability of parasites to survive within the sandfly host, as well as to establish infection in mammalian macrophages and in mice (Sacks et al., 2000; Spath et al., 2003; Secundino et al., 2010). Hence, in these species, *LPG* impairs the microbicidal mechanisms associated with the biogenesis of phagolysosomes, including assembly of the NADPH oxidase and recruitment of the v-ATPase (Lodge et al.,





2006; Vinet et al., 2009). Our results indicate that, similarly to these species, *L. infantum* LPG1 is required for replication within macrophages. Whether LPG contributes to the ability of *L. infantum* to successfully infect macrophages through the impairment of phagolysosomal biogenesis remains to be investigated. Interestingly, we observed that our  $\Delta$ lpg1 mutant parasites induced robust NF- $\kappa$ B-dependent iNOS expression compared to parental WT *L. infantum* promastigotes. This seems to suggest that the reduced survival of  $\Delta$ lpg1 mutants in mouse macrophages may be related to higher levels of iNOS, which is responsible for the generation of leishmanicidal nitric oxide (Coelho-Finamore et al., 2011; Passero et al., 2015). Further study will involve investigating the contribution of nitric oxide production with respect to the reduced ability of  $\Delta$ lpg1 mutants to survive within macrophages. The underlying mechanism by which  $\Delta$ lpg1 mutant parasites induce high levels of NF- $\kappa$ B activation remains unknown, and thus represents an additional aspect of host cell-parasite interplay that we intend to further investigate.

With regard to the partial restoration of the WT phenotype observed in  $\Delta$ lpg1 + LPG1 parasites, it has been well-documented that complemented parasites commonly do not fully recover virulence. The inappropriate regulation of LPG1 expression by the episomal vector may be a possible explanation for this observation (Späth et al., 2000; Späth et al., 2003; Joshi et al., 2002). A previous study demonstrated that *L. major* LPG1-deficient mutant promastigotes present an attenuated virulence phenotype, as evidenced by the delayed formation of lesions *in vivo* (Späth et al., 2000). In addition, this delay was associated with a 100-fold decrease in parasite survival within macrophages *in vitro*. The data presented herein are consistent with these results, as well as with other reports in the literature (Privé and Descoteaux, 2000; Sacks et al., 2000; Zhang et al., 2004) propounding LPG as a virulence factor.

Taken together, the present findings support the importance of creating LPG-deficient mutants in various *Leishmania* spp. as a unique tool to investigate the specific impact and contribution of this abundant virulence factor in the complex host cell-*Leishmania* interplay. Hence, we are currently conducting studies

to compare the responses of various immune cells to live *L. infantum* promastigotes in the presence or absence of surface-expressed LPG, since we feel it is important to thoroughly characterize these isolates to obtain a more comprehensive understanding regarding the role of *L. infantum* LPG1 in future *in vitro* and *in vivo* studies.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

ML-S, CM, JL, GA, GQ-C, AC, SM-P, UG, LE, TA-S, AD, and VB conceived and designed the study, contributed to the data analysis, drafted, and revised the manuscript. ML-S, CM, JL, GA, GQ-C, AC, SM-P, CF, FJ-S, and TA-S performed the experiments. ML-S, CM, JL, LE, TA-S, AD, and VB wrote and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of this manuscript.

## FUNDING

This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), (Grant number: 400135/2014-0 to VB), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) (Grant number: 04/2015 to VB), Science without Borders (SwB) (to VB and AD) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (grant MOP-125990 to AD). VB and UG are senior investigator funded by CNPq. AD is the holder of the Canada Research Chair on the Biology of intracellular parasitism. GA was partially supported by a CIHR Frederick Banting and Charles Best Doctoral Award. AC: received a fellowship from CNPq. The funders had no role in study design, data collection or analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Andrezza Souza for technical and logistics support. The authors would like to thank Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance.



## REFERENCES

- Araújo-Santos, T., Rodríguez, N. E., Moura-Pontes, S., Dixt, U. G., Abánades, D. R., Bozza, P. T., et al. (2014). Role of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  production in lipid bodies from *Leishmania infantum* chagasi: insights on virulence. *J. Infect. Dis.* 210, 1951–1961. doi: 10.1093/infdis/jiu299
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L. G., et al. (2003). *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130, 65–74. doi: 10.1016/S0166-6851(03)00160-9
- Bozza, P. T., Bakker-Abreu, I., Navarro-Xavier, R. A., and Bandeira-Melo, C. (2011). Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 85, 205–213. doi: 10.1016/j.plefa.2011.04.020
- Capul, A. A., Hickerson, S., Barron, T., Turco, S. J., and Beverley, S. M. (2007). Comparisons of mutants lacking the golgi UDP-galactose or GDP-mannose transporters establish that phosphoglycans are important for promastigote but not amastigote virulence in *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 75, 4629–4637. doi: 10.1128/IAI.00735-07
- Coelho-Finamore, J. M., Freitas, V. C., Assis, R. R., Melo, M. N., Novozhilova, N., Secundino, N. F., et al. (2011). *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *Int. J. Parasitol.* 41, 333–342. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.10.004
- Dermine, J. F., Scianimanico, S., Privé, C., Descoteaux, A., and Desjardins, M. (2000). *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell. Microbiol.* 2, 115–126. doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00037.x
- Descoteaux, A., Avila, H. A., Zhang, K., Turco, S. J., and Beverley, S. M. (2002). *Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *EMBO J.* 21, 4458–4469. doi: 10.1093/emboj/cdf447
- Descoteaux, A., Luo, Y., Turco, S. J., and Beverley, S. M. (1995). A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*. *Science* 269, 1869–1872. doi: 10.1126/science.7569927
- Descoteaux, A., Mengeling, B. J., Beverley, S. M., and Turco, S. J. (1998). *Leishmania donovani* has distinct mannosylphosphoryltransferases for the initiation and elongation phases of lipophosphoglycan repeating unit biosynthesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94, 27–40. doi: 10.1016/S0166-6851(98)00047-4
- Descoteaux, A., and Turco, S. J. (1993). The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol. Today* 9, 468–471. doi: 10.1016/0169-4758(93)90105-O
- Descoteaux, A., Turco, S. J., Sacks, D. L., and Matlashewski, G. (1991). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J. Immunol.* 146, 2747–2753.
- Desjardins, M., and Descoteaux, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 185, 2061–2068. doi: 10.1084/jem.185.12.2061
- de Veer, M. J., Curtis, J. M., Baldwin, T. M., DiDonato, J. A., Sexton, A., McConville, M. J., et al. (2003). MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* 33, 2822–2831. doi: 10.1002/eji.200324128
- Forestier, C. L., Gao, Q., and Boons, G. J. (2014). *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:193. doi: 10.3389/fcimb.2014.00193
- Ilg, T. (2000). Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO J.* 19, 1953–1962. doi: 10.1093/emboj/19.9.1953
- Ilg, T., Demar, M., and Harbecke, D. (2001). Phosphoglycan Repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. *J. Biol. Chem.* 276, 4988–4997. doi: 10.1074/jbc.M008030200
- Ilg, T., Montgomery, J., Stierhof, Y. D., and Handman, E. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, ppg1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *J. Biol. Chem.* 274, 31410–31420. doi: 10.1074/jbc.274.44.31410
- Joshi, P. B., Kelly, B. L., Kamhawi, S., Sacks, D. L., and McMaster, W. R. (2002). Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 33–40. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00432-7
- Kavoosi, G., Ardestani, S. K., and Kariminia, A. (2009). The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology* 136, 1193–1199. doi: 10.1017/S0031182009990473
- Lima, J. B., Araújo-Santos, T., Lázaro-Souza, M., Carneiro, A. B., Ibraim, I. C., Jesus-Santos, F. H., et al. (2017). *Leishmania infantum* lipophosphoglycan induced-Prostaglandin E2 production in association with PPAR- $\gamma$  expression via activation of Toll like receptors-1 and 2. *Sci. Rep.* 7:14321. doi: 10.1038/s41598-017-14229-8
- Lodge, R., Diallo, T. O., and Descoteaux, A. (2006). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell. Microbiol.* 8, 1922–1931. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00758.x
- McConville, M. J., and Ferguson, M. A. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem. J.* 294, 305–324. doi: 10.1042/bj2940305
- Moradin, N., and Descoteaux, A. (2012). *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:121. doi: 10.3389/fcimb.2012.00121
- Passero, L. F., Assis, R. R., da Silva, T. N., Nogueira, P. M., Macedo, D. H., Pessoa, N. L., et al. (2015). Differential modulation of macrophage response elicited by glycoinositolphospholipids and lipophosphoglycan from *Leishmania* (*Viannia*) shawi. *Parasitol. Int.* 64, 32–35. doi: 10.1016/j.parint.2015.01.006
- Privé, C., and Descoteaux, A. (2000). *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur. J. Immunol.* 30, 2235–2244. doi: 10.1002/1521-4141(2000)30:8<2235::AID-IMMU2235>3.0.CO;2-9
- Rabhi, S., Rabhi, I., Trentin, B., Piquemal, D., Regnault, B., Goyard, S., et al. (2016). Lipid droplet formation, their localization and dynamics during *leishmania major* macrophage infection. *PLoS ONE* 11:e0148640. doi: 10.1371/journal.pone.0148640
- Rojas-Bermabé, A., Garcia-Hernández, O., Maldonado-Bernal, C., Delegado-Dominguez, J., Ortega, E., Gutiérrez-Kobeh, L., et al. (2014). *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan activates ERK and p38 MAP kinase and induces production of proinflammatory cytokines in human macrophages through TLR2 and TLR4. *Parasitology* 141, 788–800. doi: 10.1017/S0031182013002187
- Ryan, K. A., Garraway, L. A., Descoteaux, A., Turco, S. J., and Beverley, S. M. (1993). Isolation of virulence genes directing surface glycosylphosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8609–8613. doi: 10.1073/pnas.90.18.8609
- Sacks, D., and Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 453–483. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.453
- Sacks, D. L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S. J., et al. (2000). The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 406–411. doi: 10.1073/pnas.97.1.406
- Secundino, N., Kimblin, N., Peters, N. C., Lawyer, P., Capul, A. A., Beverley, S. M., et al. (2010). Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cell. Microbiol.* 12, 906–918. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01439.x
- Späth, G. F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S. M., Avila, H. A., Turco, S. J., et al. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 9258–9263. doi: 10.1073/pnas.160257897
- Späth, G. F., Garraway, L. A., Turco, S. J., and Beverley, S. M. (2003). The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 9536–9541. doi: 10.1073/pnas.1530604100
- Tavares, N. M., Araújo-Santos, T., Afonso, L., Nogueira, P. M., Lopes, U. G., Soares, R. P., et al. (2014). Understanding the mechanisms controlling

- Leishmania amazonensis* infection *in vitro*: the role of LTB4 derived from human neutrophils. *J. Infect. Dis.* 210, 656–666. doi: 10.1093/infdis/jiu158
- Turco, S., Descoteaux, A., Ryan, K., Garraway, L., and Beverley, S. (1994). Isolation of virulence genes directing GPI synthesis by functional complementation of *Leishmania*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27, 133–138.
- Turco, S. J., and Descoteaux, A. (1992). The lipophosphoglycan of leishmania parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 65–94. doi: 10.1146/annurev.mi.46.100192.000433
- Vinet, A. F., Fukuda, M., Turco, S. J., and Descoteaux, A. (2009). The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of Synaptotagmin, V. *PLoS Pathog.* 5:e1000628. doi: 10.1371/journal.ppat.1000628
- Zhang, K., Barron, T., Turco, S. J., and Beverley, S. M. (2004). The LPG1 gene family of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 136, 11–23. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.02.012

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer LM declared a shared affiliation, with no collaboration, with two of the authors, AC and UG, to the handling Editor.

Copyright © 2018 Lázaro-Souza, Matte, Lima, Arango Duque, Quintela-Carvalho, de Carvalho Vivarini, Moura-Pontes, Figueira, Jesus-Santos, Gazos Lopes, Farias, Araújo-Santos, Descoteaux and Borges. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





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

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

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

## OPEN ACCESS

### Edited by:

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

### Reviewed by:

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

### \*Correspondence:

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

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

### Specialty section:

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

Received: 19 April 2018

Accepted: 24 July 2018

Published: 14 August 2018

### Citation:

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

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

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



## Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell



Thassila N. Pitanga<sup>a,b</sup>, Ricardo R. Oliveira<sup>a</sup>, Dalila L. Zanette<sup>a</sup>, Caroline C. Guarda<sup>a</sup>, Rayra P. Santiago<sup>a</sup>, Sanzio S. Santana<sup>a</sup>, Valma M.L. Nascimento<sup>c</sup>, Jonilson B. Lima<sup>a</sup>, Grazielle Q. Carvalho<sup>a</sup>, Vitor V. Maffili<sup>a</sup>, Magda O.S. Carvalho<sup>a,d</sup>, Luiz C.J. Alcântara<sup>a</sup>, Valéria M. Borges<sup>a</sup>, Marilda S. Goncalves<sup>a,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA, 40296710 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), 40110902 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>c</sup> Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), 40286240 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>d</sup> Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), UFBA, 40110060 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>e</sup> Faculdade de Farmácia, UFBA, 40170115 Salvador, Bahia, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 December 2015

Received in revised form 8 March 2016

Accepted 21 March 2016

#### Keywords:

Sickle cell anemia

Sickle red cell

IL-1 $\beta$

Leukotriene B4

NLRP3 inflammasome

Toll-like receptors

### ABSTRACT

This study tested the hypothesis that sickle red blood cell (SS-RBC) induce Toll-like receptors (TLR) and Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3)- inflammasome expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). TLR and NLRP3 inflammasome could contribute to the maintenance of the inflammatory status in sickle cell anemia (SCA) patients, since SS-RBC act as danger signals activating these pathways. In this study, first, we evaluated *TLR* (2, 4, 5 and 9), *NLRP3*, *Caspase-1*, *interleukin* (*IL*-1 $\beta$ ) and *IL-18* expression in PBMC freshly isolated from SCA patients (SS-PBMC) in comparison with PBMC from healthy individuals (AA-PBMC). In the second moment, we investigated whether SS-RBC could interfere with the expression of these molecules in PBMC from healthy donor, in the absence or presence of hydroxyurea (HU) in vitro. TLRs and NLRP3 inflammasome expression were investigated by qPCR. IL-1 $\beta$ , Leukotriene-B4 (LTB<sub>4</sub>) and nitrite production were measured in PBMC (from healthy donor) culture supernatants. *TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, *NLRP3* and *IL-1 $\beta$*  were highly expressed in SS-PBMC when compared to AA-PBMC. Additionally, SS-RBC induced *TLR9*, *NLRP3*, *Caspase-1*, *IL-1 $\beta$*  and *IL-18* expression and induced IL-1 $\beta$ , LTB<sub>4</sub> and nitrite production in PBMC cultures. HU did not prevent *TLR* and *NLRP3* inflammasome expression, but increased *TLR2* and *IL-18* expression and reduced nitrite production. In conclusion, our data suggest that TLR and inflammasome complexes may be key inducers of inflammation in SCA patients, probably through SS-RBC; also, HU does not prevent NLRP3 inflammasome- and TLR-dependent inflammation, indicating the need to develop new therapeutic strategies to SCA patients that act with different mechanisms of those observed for HU.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Abbreviations:** AA-PBMC, peripheral blood mononuclear cells freshly isolated from healthy individuals; AA-RBC, red blood cell from healthy individuals; ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing card; DAMPs, damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs); HbF, fetal hemoglobin; HMGB1, high-mobility group protein B1; HU, hydroxyurea; LT, leukotriene; LTB<sub>4</sub>, leukotriene B4; NLR, Nod-like receptors; NLRP3, Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; RBC, red blood cell; SCA, sickle cell anemia; SCD, sickle cell disease; SS-PBMC, peripheral blood mononuclear cells freshly isolated from sickle cell anemia patients; SS-RBC, red blood cells from sickle cell anemia patients; TLR, Toll-like receptors.

\* Corresponding author at: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional, Rua Waldemar Falcão, n. 121, Candeal, 40296710 Salvador, Bahia, Brazil.

E-mail address: [mari@bahia.fiocruz.br](mailto:mari@bahia.fiocruz.br) (M.S. Goncalves).

### 1. Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is a genetic disorder characterized by the production of abnormal red blood cells, homozygosity of hemoglobin S (HbS) and oxygen transport dysfunction. Clinically, SCA patients can be in a steady state, with subclinical manifestations, or in crisis, showing systemic inflammation, with vaso-occlusive phenomena and painful episodes, as well as susceptibility to infections and hemolysis [1–3]. SCA has been characterized as a chronic inflammatory state, with abnormal activation and elevated number of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs),