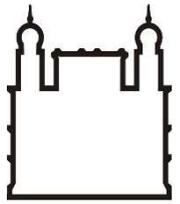




UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE NEUTRÓFILOS HUMANOS NO
CONTROLE DA INFEÇÃO DE *LEISHMANIA*
AMAZONENSIS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS**

RAFAEL TEIXEIRA TIBÚRCIO DOS SANTOS

Salvador- Bahia

2019

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE NEUTRÓFILOS HUMANOS NO
CONTROLE DA INFECÇÃO DE *LEISHMANIA
AMAZONENSIS* EM CÉLULAS DENDRÍTICAS**

RAFAEL TEIXEIRA TIBÚRCIO DOS SANTOS

Orientadora: Dr^a Claudia Ida Brodskyn

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

Salvador- Bahia

2019

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

S237a Santos, Rafael Teixeira Tibúrcio dos.
Avaliação do papel de neutrófilos humanos no controle da infecção de
Leishmania Amazonensis em células dendríticas. / Rafael Teixeira Tibúrcio dos
Santos. - 2019.
77 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr^a Claudia Ida Brodskyn, Laboratório de Inflamação e
Biomarcadores.

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

1. Neutrófilos. 2. Células dendríticas. 3. Leishmania. 4. Reguladores
lipídicos. I. Título.

CDU 616.993.161

"AVALIAÇÃO DO PAPEL DE NEUTRÓFILOS HUMANOS NO CONTROLE DA INFECÇÃO DE
L. AMAZONENSIS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS".

Rafael Teixeira Tibúrcio dos Santos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 11 de junho de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar
Professora
UFBA



Dra. Deboraci Brito Prates
Professora
UFBA



Dra. Cláudia Ida Brodskyn
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"

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por sua doçura, atenção, pelos sacrifícios, por celebrar cada vitória minha como se fosse sua, e pelo amor incomensurável que foi minha força motriz durante estes 2 anos de pós-graduação.

Ao meu pai, pelo companheirismo, incentivo e ensinamentos.

Aos meus familiares, especialmente, a meu TUGA (the Uncle and godfather) Denilton e à minha avó e madrinha Dirce, por todo apoio e confiança.

À minha orientadora Dr^a Cláudia Brodskyn, pelas lições, por contribuir significativamente na minha formação acadêmica.

Aos queridos professores do PgPat, pelas oportunidades, pelas portas abertas e pelas preciosas contribuições.

Aos meus amigos e companheiros LaIPHE: Elaine, Leon, Reinan, Ivaneia, Icaro, Priscila, Camila, Ana Luisa, Sara e Mariana, por fazerem meus dias mais alegres e os experimentos mais ou menos produtivos.

A todos os colegas do LaIPHE, por proporcionarem um excelente e harmonioso ambiente de trabalho.

À biblioteca do IGM, pelas orientações na dissertação final.

Aos meus amigos de biologia e da vida: Lana Adrielle, Felipe Fonseca, Gisele Conceição, Thirza Santana, Gabriela Amaral.

Ao IGM, por todo apoio

“Poderia viver encerrado numa casca de noz e julgar-me o rei do espaço
infinito, não tivesse eu sonhos atormentados”

William Shakespeare

SANTOS, Rafael Teixeira Tibúrcio dos. Avaliação do papel de neutrófilos humanos no controle da infecção de *Leishmania Amazonensis* em células dendríticas. 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: As leishmanioses constituem uma coletânea de doenças de caráter negligenciado que afligem milhões de pessoas em escala global. Tal patologia é causada por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* cujos vetores de transmissão são artrópodes flebotomíneos que albergam o parasito. A infecção se inicia durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo, quando ocorre a inoculação das formas promastigotas do parasita e componentes salivares imunomodulatórios na pele do hospedeiro mamífero. Diversos tipos de células imunes participam sinergicamente da resposta contra a *Leishmania*. Dentre estas células, destacam-se os neutrófilos, células polimorfonucleares que desempenham papel fundamental no recrutamento e ativação de outras células imunológicas. Neutrófilos são capazes de estabelecer um diálogo íntimo com células dendríticas através de receptores de membrana como o DC-SIGN, promovendo então o estabelecimento de respostas imunológicas integradas no controle da infecção. Contudo, pouco se sabe a respeito do papel de neutrófilos ativados no desfecho da infecção de *Leishmania amazonensis* em células dendríticas humanas. **OBJETIVO:** O presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos empregados por neutrófilos humanos no controle da infecção por *L. amazonensis* em células dendríticas. **MATERIAL E MÉTODOS:** neutrófilos e células dendríticas humanas foram purificadas a partir de sangue periférico de doadores saudáveis. Os neutrófilos foram ativados com fibronectina por 1 hora e subsequentemente incubados com células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*. **RESULTADOS:** Nossos resultados apontam a participação dos neutrófilos no controle da infecção de maneira independente do seu estado de ativação. A neutralização de enzimas presentes nos grânulos dos neutrófilos apontou que a eliminação do parasita ocorre de maneira independente de tais enzimas. Verificamos que a destruição de *Leishmania* foi dependente do contato direto via DC-SIGN entre neutrófilos e células dendríticas. Observamos que a produção de mediadores lipídicos e maturação de células dendríticas também ocorreu de maneira dependente deste receptor. Por fim, observamos que a destruição parasitária necessitou da participação do TNF α e LTB $_4$ produzidos na co-cultura. **CONCLUSÃO:** Coletivamente, nossos resultados demonstraram que neutrófilos humanos modulam tanto a maturação como a capacidade de células dendríticas infectadas em destruir o parasito de maneira dependente do contato físico direto por intermédio do DC-SIGN e da subsequente produção de TNF α e mediadores lipídicos.

Palavras-chave: Neutrófilos, Células dendríticas, *Leishmania*, DC-SIGN, Mediadores lipídicos

SANTOS, Rafael Teixeira Tibúrcio dos. Evaluation of the role of human neutrophils in the control of *Leishmania Amazonensis* infection in dendritic cells. 2019. 77 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Leishmaniasis is a collection of neglected diseases that afflict millions of people on a global scale. This pathology is caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania* whose transmission vectors are phlebotominal arthropods that harbor the parasite. The infection begins during the blood meal of sand flies, when the promastigote forms of the parasite and immunomodulatory salivary components in the skin of the mammalian host occurs. Several types of immune cells participate synergistically in the response against *Leishmania*. Among these cells, neutrophils, polymorphonuclear cells that play a key role in the recruitment and activation of other immune cells, stand out. Neutrophils are able to establish an intimate dialogue with dendritic cells through membrane receptors such as DC-SIGN, thus promoting the establishment of integrated immune responses in the control of infection. However, little is known about the role of activated neutrophils in the outcome of *Leishmania amazonensis* infection in human dendritic cells. **OBJECTIVE:** The present study sought to investigate the relevance of the interaction between activated neutrophils and infected dendritic cells in the course of in vitro infection by *L. amazonensis*. **MATERIAL AND METHODS:** Neutrophils and human dendritic cells were purified from peripheral blood from healthy donors. Neutrophils were activated with fibronectin for 1 hour and subsequently incubated with dendritic cells infected by *L. amazonensis*. **RESULTS:** Our results indicate the participation of neutrophils in infection control independently of their activation state. Neutralization of enzymes present in the neutrophil granules pointed out that elimination of the parasite occurs independently of such enzymes. We found that the destruction of *Leishmania* was dependent on direct contact via DC-SIGN between neutrophils and dendritic cells. We note that the production of lipid mediators and maturation of dendritic cells also occurred in a manner dependent on this receptor. Finally, we observed that parasite destruction needed the participation of TNF α and LTB₄ produced in the co-culture. **CONCLUSION:** Our results have shown that human neutrophils modulate both the maturation and the ability of infected dendritic cells to destroy the parasite in a manner dependent on direct physical contact through DC-SIGN and the subsequent production of TNF α and lipid mediators.

Key words: Neutrophils, Dendritic cells, *Leishmania*, DC-SIGN, Lipid mediators

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Quadro epidemiológico da Leishmaniose em escala global, em 2016..	15
Figura 2 . Ciclo de vida de protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	17
Figura 3 . Resposta imune inata frente à infecção de <i>Leishmania</i> spp.....	22
Figura 4 . Os Processos de recrutamento e ativação de neutrófilos.	26
Figura 5 – Regulação exercida por células dendríticas e macrófagos sob a infecção por <i>Leishmania</i> sp.....	29
Figura 6 . Análise <i>in vitro</i> da relevância de neutrófilos no controle das taxas de infecção e carga parasitária de células dendríticas infectadas por <i>Leishmania amazonensis</i> ..	41
Figura 7 - Investigação do papel das enzimas neutrofílicas no processo de eliminação parasitária em células dendríticas infectadas por <i>L. amazonensis</i> ..	43
Figura 8 - Avaliação do efeito do contato direto entre células dendríticas infectadas por <i>L. amazonensis</i> e neutrófilos ativados sob as taxas de infecção e carga parasitária.....	45
Figura 9 - Análise <i>in vitro</i> papel do TNF- α no controle da infecção de <i>L. amazonensis</i> em células dendríticas co-cultivadas com neutrófilos humanos ativados.	47
Figura 10 - Quantificação dos mediadores lipídicos nos sobrenadantes de neutrófilos ativados cultivados com células dendríticas infectadas.....	49
Figura 11 - Avaliação do papel do LTB ₄ na eliminação do parasita em células dendríticas.....	51
Figura 12 – Determinação dos níveis de maturação de células dendríticas cultivadas com neutrófilos ativados.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
COX	Ciclooxigenase
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo
DCs	Células Dendríticas
DC-SIGN	DC Specific Intracellular Adhesion Molecule 3
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
IFN	Interferon
IL-33	Interleucina -33
LCD	Leishmaniose cutânea dissiminada
LCL	Leishmaniose cutâneo -localizada
LCM	Leishmaniose cutânea mucosa
LD	Leishmaniose cutânea difusa
LFA-1	Lymphocyte Function – associated antigen 1
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipossacarídeo
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTB ₄	Leucotrieno B4
LV	Leishmaniose Visceral
MAC-1	Macrophage-1 antigen
MMP-9	Metaloproteinase -9
MPO	Mieloperoxidase
NE	Elastase neutrofílica
NETs	“ <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> ”
OMS	Organização mundial da saúde
PAMPs	(do inglês, padrões moleculares associados a patógenos)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PMN	Polifomonucleares
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SBF	Soro Bovino Fetal
TFN- α	Tumor Necrosis Factor α
TGF- β	Transforming growth Factor - β

SUMÁRIO

1	
1	INTRODUÇÃO 14
1.	LEISHMANIOSES: ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA 14
3	O CICLO DE VIDA DE <i>LEISHMANIA</i> SPP 16
4	ASPECTOS CLÍNICOS DAS LEISHMANIOSES 17
5	RESPOSTA IMUNE CONTRA LEISHMANIA 19
5.1	OS MECANISMOS DA RESPOSTA IMUNE INATA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA..... 19
5.2	NEUTRÓFILOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E FUNÇÃO MICROBICIDA 22
5.3	O PROCESSO DE ATIVAÇÃO NEUTROFÍLICA..... 25
5.4	IMUNOBIOLOGIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS..... 27
5.5	COMUNICAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS 29
6	JUSTIFICATIVA 31
7	HIPÓTESE..... 31
8	OBJETIVO GERAL 32
8.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 32
9	MATERIAIS E MÉTODOS..... 33
10	DESENHOS EXPERIMENTAIS 38
11	RESULTADOS..... 40
11.1	NEUTRÓFILOS ATIVADOS E EM REPOUSO SÃO CAPAZES DE RESTRINGIR A INFECÇÃO DE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i> EM CÉLULAS DENDRÍTICAS..... 40
11.2	A DEGRANULAÇÃO DE ENZIMAS NEUTROFÍLICAS NÃO CONTRIBUI PARA A ELIMINAÇÃO DOS PARASITAS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS..... 42
11.3	A ELIMINAÇÃO DO PARASITA DEPENDE DO ESTABELECIMENTO DE CONTATO DIRETO ENTRE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> E NEUTRÓFILOS ATRAVÉS DO DC-SIGN. 44
11.4	O CONTROLE DA INFECÇÃO DE <i>L. AMAZONENSIS</i> EM CÉLULAS DENDRÍTICAS CULTIVADOS COM NEUTRÓFILOS ATIVADOS OCORRE DE MANEIRA DEPENDENTE DE TNFA. 46
11.5	A INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS VIA DC-SIGN REGULA A PRODUÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS..... 48
11.6	O LEUCOTRIENO B4 PRODUZIDO ATRAVÉS DA INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS DENDRÍTICAS E NEUTRÓFILOS CONTRIBUI PARA A ELIMINAÇÃO DE <i>L. AMAZONENSIS</i> 50
11.7	NEUTRÓFILOS PROMOVEM MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> DE MANEIRA DEPENDENTE DE DC-SIGN. .. 52

12 DISCUSSÃO.....	56
13 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

1. LEISHMANIOSES: ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA

As leishmanioses figuram entre um dos problemas de saúde pública mais importantes em escala global, acometendo pessoas em mais de 88 países distribuídos ao longo de 5 continentes. O seu agente etiológico é o protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) com mais de 20 espécies conhecidas. Esta antropozoonose é transmitida a seres humanos, além de outros mamíferos, por intermédio de vetores artrópodes flebotomíneos (ALVAR et al., 2012; PIGOTT et al., 2014).

A organização mundial da saúde (OMS) classifica as leishmanioses como um conjunto de doenças de caráter emergente e negligenciado, com cerca de 2 milhões de novos casos registrados anualmente. Estima-se que, atualmente, cerca de 12 milhões de pessoas estejam infectadas e que aproximadamente 350 milhões vivam em áreas onde as leishmanioses são endêmicas (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2016) (Figura 1).

A entrada dos vetores flebotomíneos em áreas peridomiciliares influencia na vulnerabilidade de populações de áreas rurais e de expansão urbana em contrair a infecção. Além dos aspectos geográficos, outros fatores socioeconômicos estão invariavelmente atrelados ao risco de se contrair leishmaniose (CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

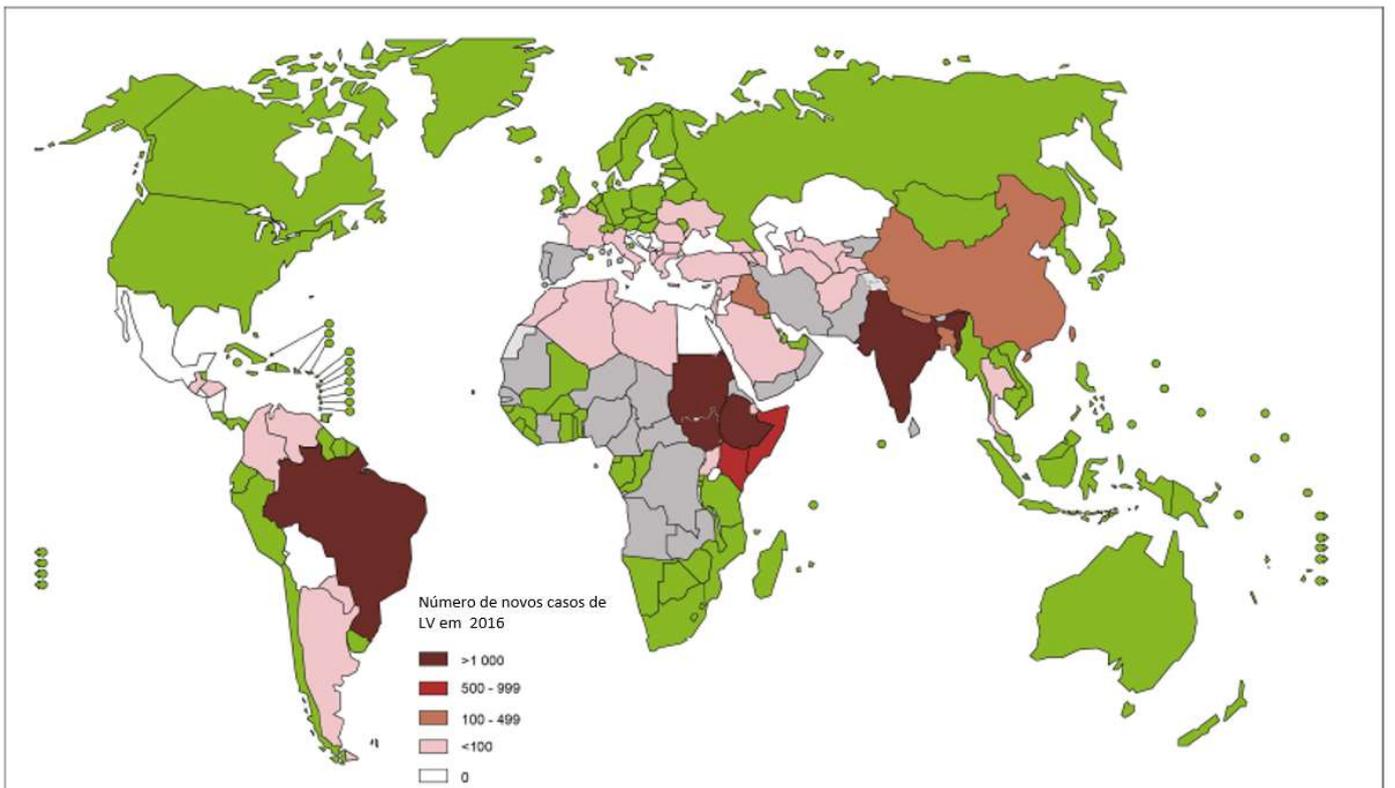
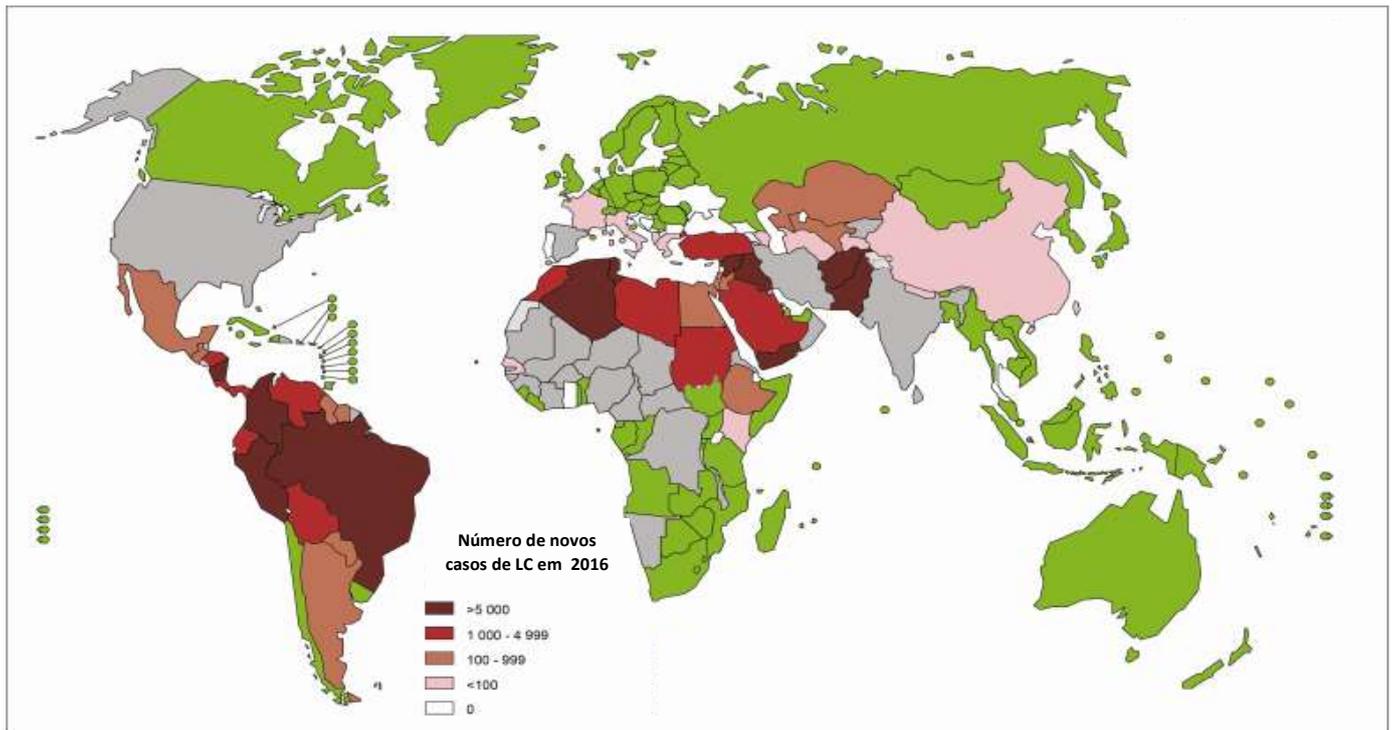


Figura 1 . Quadro epidemiológico da Leishmaniose em escala global, em 2016. (Figura superior) Leishmaniose cutânea; (Figura inferior) Leishmaniose Visceral.

3 O CICLO DE VIDA DE *LEISHMANIA* SPP

Uma das principais características do gênero *Leishmania* é o seu caráter digenético, por apresentarem duas formas evolutivas no seu ciclo de vida, que são as formas promastigotas e amastigota (KAYE; SCOTT, 2011). A *Leishmania* tem o seu ciclo biológico dividido entre hospedeiros mamíferos, nos quais é encontrada na forma de amastigotas, e hospedeiros flebotomíneos, onde os parasitas vivem como promastigotas (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). Seus principais vetores são invertebrados do gênero *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo) (BATES, 2007).

As formas promastigotas de *Leishmania* são caracterizadas por possuírem flagelos e terem elevada motilidade. Tais promastigotas são encontradas no trato digestivo dos seus vetores, e submetem-se a complexos processos de diferenciação até alcançarem a sua forma infectante, promastigotas metacíclicas, com baixa ou nenhuma capacidade de divisão (HANDMAN; BULLEN, 2002). A transmissão natural ocorre na ocasião em que a fêmea do vetor se alimenta no repasto sanguíneo. Neste momento, ocorre a inoculação de parasitos no hospedeiro, juntamente com fatores salivares e outros compostos envolvidos no desfecho da infecção (BATES, 2007).

Logo após a inoculação da *Leishmania*, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células que compõe o sistema imune inato do hospedeiro localizadas no sitio da picada (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Então, o parasita passará por processos de diferenciação fenotípica que culmina na aquisição da forma amastigota que são capazes de se replicar no seu nicho intracelular, o fagolisossomo de fagócitos. Uma vez que a densidade de parasitos no interior da célula atinge um limiar, há ruptura da mesma, e externalização dos parasitos (KAYE; SCOTT, 2011). Isso permite a reinfecção local de outras células fagocíticas e propagação do parasita no hospedeiro. O ciclo é finalizado quando tais células infectadas são capturadas por outra fêmea do vetor invertebrado durante o processo de alimentação (KAMHAWI, 2006) (Figura 2).

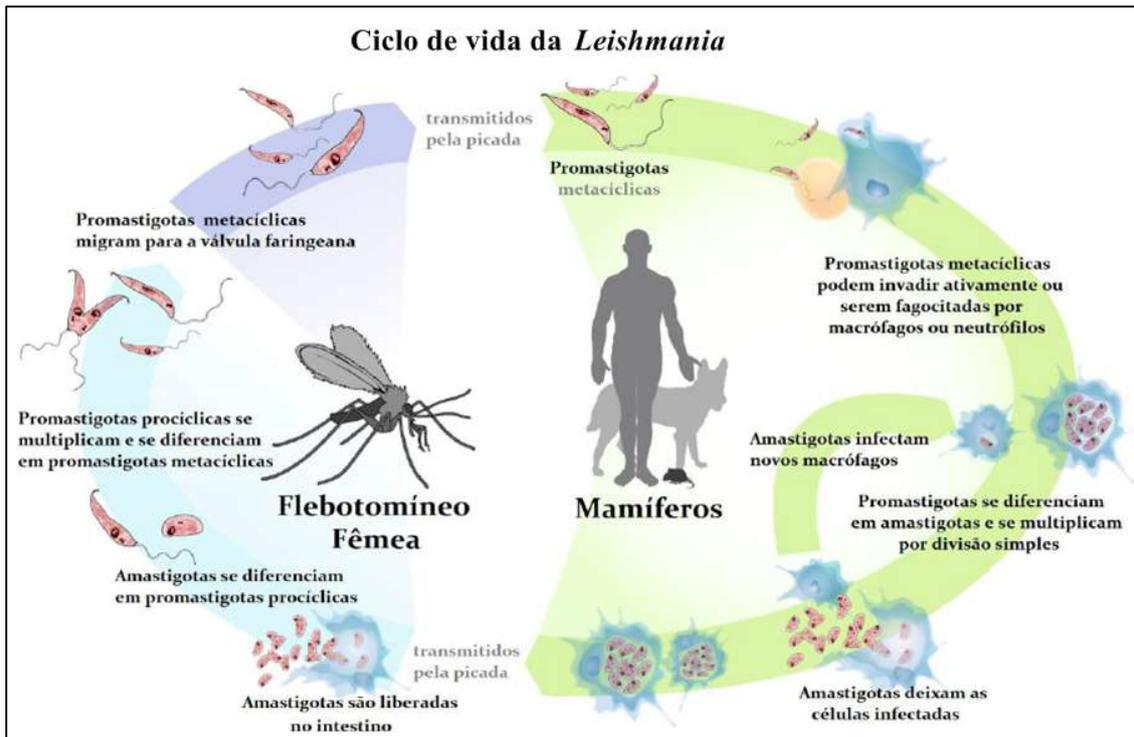


Figura 2. Ciclo de vida de protozoários do gênero *Leishmania* – Inicialmente formas promastigotas procíclicas de *Leishmania*, que residem no intestino dos flebotomíneos, passam por processos de diferenciação até alcançarem a forma metacíclica. Posteriormente, as promastigotas metacíclicas migram para regiões anteriores do trato digestivo do inseto, onde serão inoculadas na pele do hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo. A presença da *Leishmania* e de diferentes componentes dos flebotomíneos desencadeiam respostas imunes contra o parasita, inicialmente caracterizada pela ação fagocítica de determinados leucócitos, como exemplo, neutrófilos e macrófagos. No interior do fagolisossomo de macrófagos, o parasita diferencia-se em sua forma amastigota, dotada de capacidade proliferativa. Após extensiva multiplicação parasitária, a célula hospedeira se rompe liberando amastigotas de *Leishmania* que irão infectar células vizinhas. O ciclo de vida da *Leishmania* se completa quando fêmeas de flebotomíneos adquirem células infectadas diante de um novo evento de repasto sanguíneo. (Adaptado de National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2012).

4 ASPECTOS CLÍNICOS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses constituem uma coletânea de doenças que apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas (SCHRIEFER; WILSON; CARVALHO, 2008). As formas principais desta doença podem ser dicotomicamente classificadas como Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT).

A leishmaniose visceral é uma forma sistêmica da doença, de elevada gravidade, podendo alcançar altos níveis de fatalidade se não tratada (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2016). O aspecto mais conspícuo da LV é uma infecção de caráter generalizado que acomete, principalmente, o baço, fígado, linfonodos e a medula óssea (BARRAL et al., 1995).

O agente etiológico da leishmaniose visceral é a *L. donovani* nas regiões do Leste Africano e do subcontinente da Índia, e *L. infantum* no norte da África, América Latina e Europa (CHAPPUIS et al., 2007).

A leishmaniose tegumentar tem ampla distribuição ao redor do mundo e é caracterizada pelo surgimento de úlceras ou nódulos, comumente em áreas expostas do corpo, como face, braços e pernas (CHAPPUIS et al., 2007). A LT pode ser fracionada em 4 subgrupos: Leishmaniose cutâneo-localizada (LCL), leishmaniose cutânea mucosa (LCM), Leishmaniose cutânea difusa (LD) e leishmaniose cutânea disseminada (LCD).

A leishmaniose cutâneo-localizada (LCL) é a manifestação clínica de maior ocorrência, sendo caracterizada pelo desenvolvimento de lesões ulceradas, com fundo de aspecto granuloso, bordas delimitadas e eritematosas, encontradas no sítio de inoculação dos parasitas pelo flebotomíneos (MARSDEN, 1986). No Brasil, a maioria dos casos de LCL é causada pelas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (SILVEIRA et al., 2008).

O surgimento de inúmeras lesões não-ulcerativas, oriundas da disseminação do parasita através de vias linfáticas e hematogênicas, é a peculiaridade da leishmaniose cutânea disseminada (MARSDEN, 1986). A LCD é causada principalmente pelas *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. aethiopica*. Embora tais lesões tendam a não se curar espontaneamente, a LCD não oferece risco de morte aos indivíduos portadores. Contudo, o diagnóstico tardio e precário, pode levar ao aumento do tamanho da lesão e estabelecimento de infecções secundárias bacterianas (DAVID; CRAFT, 2009).

A migração dos parasitas do local de inoculação para a mucosa nasofaríngea caracteriza a leishmaniose cutânea mucosa (LCM). A LCM é produto de uma resposta imune exacerbada contra os parasitas e pode levar ao desenvolvimento de lesões destrutivas nas mucosas (REITHINGER et al., 2007). A leishmaniose difusa, causada principalmente pela *L. amazonensis*, é caracterizada pelo aparecimento de lesões nodulares de variados tamanhos em diversas regiões do corpo.

As lesões de LT tendem a cura espontânea, entretanto, uma intervenção medicamentosa com drogas leishmanicidas é requisitada em grande parte dos casos (DAVID; CRAFT, 2009). Segundo Costa- Filho e colaboradores (2008), a droga referência contra a LCM é o antimoniato de N-metil-glucomina (DA COSTA FILHO; LUCAS; SAMPAIO, 2008).

O desfecho da infecção por *Leishmania sp* e suas manifestações clínicas estão intrinsecamente relacionadas com as peculiaridades da espécie do parasito, resistência imunológica do hospedeiro, além de fatores genéticos e ambientais (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013; OGHUMU et al., 2010).

5 RESPOSTA IMUNE CONTRA LEISHMANIA

5.1 OS MECANISMOS DA RESPOSTA IMUNE INATA NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Transgressões da homeostase tecidual são acompanhadas pelo desenvolvimento local de um foco inflamatório, caracterizado pelo aparecimento dos pontos cardinais da inflamação: calor, rubor, dor, edema e disfunção. Este processo, conhecido como inflamação, tem em última instância a função de promover o equilíbrio fisiológico e confere uma resposta protetora contra uma série de estímulos nocivos, como invasão de patógenos ou dano tecidual (NETEA et al., 2018).

Durante o estabelecimento do processo inflamatório, ocorre o massivo deslocamento de leucócitos (células especializadas em promover o reestabelecimento da homeostase e defesa do organismo) para o sítio da infecção. Os leucócitos que constituem o sistema imune inato são a primeira linha de defesa do organismo durante a infecção parasitária pela *Leishmania* (NYLÉN; GAUTAM, 2010). Inúmeros tipos celulares atuam sinergicamente para estabelecer uma resposta imune apropriada contra o parasito. Concomitantemente à inoculação de promastigotas metacíclicas pelo vetor na derme do hospedeiro, há a transferência de secreções salivares dos flebótomos de natureza imunomoduladora (ROHOUŠOVÁ; VOLF, 2006). A presença de tais substâncias impacta diretamente na atividade de células fagocíticas, e contribuem para o sucesso invasivo da *Leishmania*.

A pele é um órgão composto por uma variedade de células com função imunológica, como células de Langerhans, células dendríticas dermais, macrófagos e linfócitos T, além de queratinócitos, que secretam inúmeras quimiocinas e citocinas em resposta a presença de patógenos (KAYE; SCOTT, 2011). Inicialmente, as promastigotas recém-inoculadas são fagocitadas por diversos leucócitos, incluindo macrófagos tecido-residentes, células dendríticas (DCs) dermais ou neutrófilos (VON STEBUT ET AL, 2007). Danos causados aos vasos capilares e aos tecidos que circundam o sítio de inoculação induzem a liberação de moléculas conhecidas como alarminas, por exemplo interleucina -33 (IL-33), que auxiliam no recrutamento de neutrófilos (revisto em AMULIC et al., 2012). Estudos in vitro revelam que, nos momentos iniciais da infecção, ocorre um extensivo recrutamento de neutrófilos para o foco da infecção (PETERS et al., 2008).

Uma das principais respostas do neutrófilo à *Leishmania* é a fagocitose, que tem como consequência a fusão do fagolisossomo contendo tais parasitas com grânulos (repletos de substâncias microbicidas) presentes no citoplasma dos neutrófilos (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Contudo, muitas espécies de *Leishmania* são capazes de subverter o arsenal leishmanicida dos neutrófilos, replicando-se no interior dos mesmos, e eventualmente promovendo a ruptura desta célula (CHARMOY et al., 2010). A *Leishmania major* consiste em um emblemático exemplo de subversão da maquinaria microbicida dos neutrófilos (LAUFS et al., 2002).

A infecção de neutrófilos ativa principalmente vias de morte celular e promovem a liberação de fatores que propiciam sua remoção por macrófagos ou células dendríticas, que eventualmente são infectados (JOHN; HUNTER, 2008). O resultado da interação entre neutrófilos apoptóticos e macrófagos é a liberação da citocina anti-inflamatória TGF- β , e supressão de TNF - α (pro-inflamatória), o que contribui para a sobrevivência do parasito (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). Além disso, a morte dos neutrófilos culmina na externalização do parasita (que posteriormente irão infectar outras células mielóides) e de alarminas, que recrutam células dendríticas derivadas de monócitos (DCs) para o sítio inflamatório. As recém-chegadas DCs são então infectadas pelos parasitas, e estas migram para os linfonodos a fim de realizar os eventos de apresentação de antígeno (AMULIC et al., 2012).

Os fatores inflamatórios desencadeados nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania* spp também são responsáveis pela atração de monócitos para o foco

infeccioso. É importante salientar que a migração de neutrófilos e monócitos ocorre em uma sequência temporal. Os monócitos são estimulados no sítio de inflamação e passam por um processo de diferenciação, dando origem aos macrófagos e células dendríticas (estas últimas serão discutidas nas próximas sessões) (KAYE; SCOTT, 2011). Os macrófagos, por sua vez, são responsáveis pela secreção de diversos mediadores inflamatórios, incluindo as interleucinas 6 e 12 (IL-6 e IL-12), óxido nítrico (NO), e fator de necrose tumoral (TNF α). Tipicamente, a diferenciação dos macrófagos pode acontecer de duas maneiras distintas. A ativação clássica de macrófagos (mediada por IFN- γ) está relacionada a expressão de iNOS e alta produção de espécies reativas de oxigênio, culminando na destruição de patógenos intracelulares (GORDON; MARTINEZ, 2010). A via alternativa de ativação de macrófagos ocorre através da exposição destas células a IL-4 e IL-13. Macrófagos alternativamente ativados são reconhecidos pelo aumento da atividade enzimática da arginase, que favorece a proliferação de *Leishmania* spp (WAGER; WORMLEY, 2014) (Figura 3).

Mediadores lipídicos também assumem papel de destaque no estabelecimento da imunidade contra a *Leishmania* spp. Tipicamente, os mediadores lipídicos constituem uma rede complexa de lipídios bioativos que derivam de ácidos graxos polisaturados contendo 20 carbonos (BENNETT; GILROY, 2016). Inicialmente, frente a diversos estímulos como a presença de patógenos ou citocinas, o ácido araquidônico, um ácido graxo essencial localizado na membrana celular, é metabolizado pela enzima fosfolipase A2 (PLA2), promovendo a concentração de ácido araquidônico no citosol assim como em outros subcompartimentos celulares (DENNIS; NORRIS, 2015). Posteriormente, o ácido araquidônico pode ser metabolizado por três vias enzimáticas distintas para dando origem às diversas classes de eicosanóides. A via da ciclooxigenase (COX) dá origem as prostaglandinas e tromboxanos, que coletivamente possuem grande influência nos processos da inflamação. O citocromo P450 atuam enzimaticamente na biossíntese de ácidos epoxieicosatrienóicos. Por fim, os leucotrienos e lipoxinas são outra classe de eicosanóides derivadas da via da lipoxigenase (LOX) (BENNETT; GILROY, 2016). Dados presentes na literatura apontam o LTB4 como potente indutor do estabelecimento de respostas pro-inflamatórias, inclusive no contexto de infecção por *Leishmania* spp (CHAVES; CANETTI; COUTINHO-SILVA, 2016; MORATO et al., 2014a; TAVARES et al., 2014). Dentre as funções imunológicas atribuídas ao LTB4, destacam-se a capacidade de quimioatração de diversos tipos celulares como neutrófilos, monócitos e

DCs, indução da migração de DCs para órgãos linfóides e indução de síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) (PRETE et al., 2011)

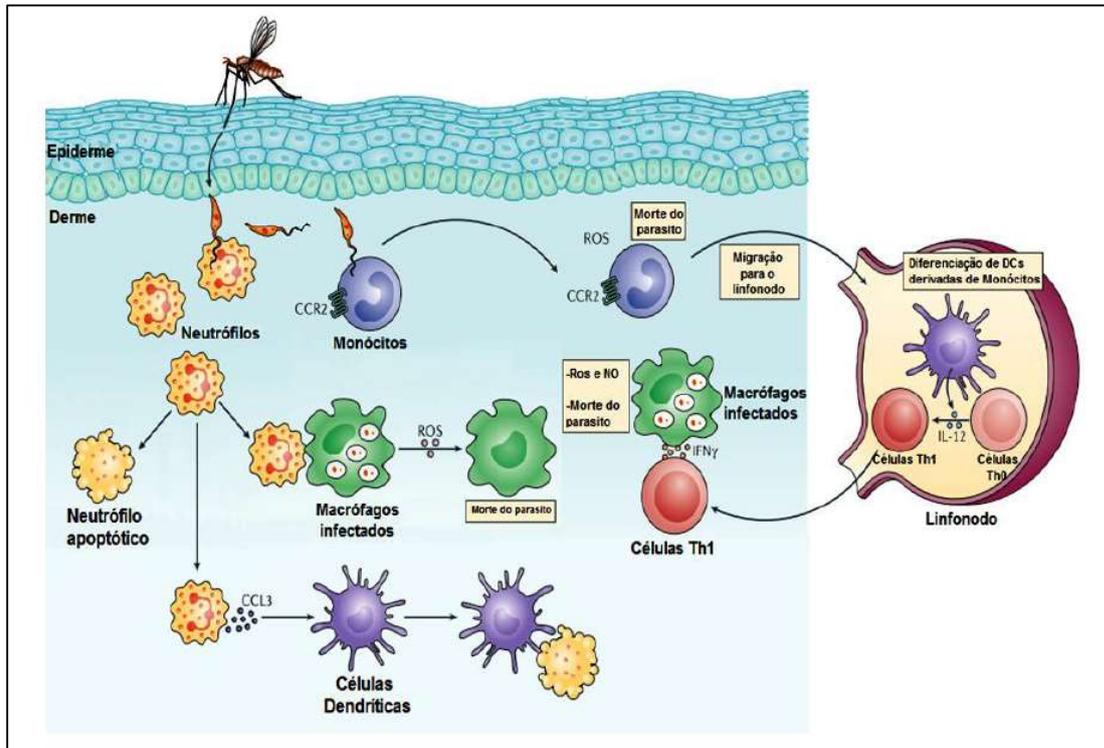


Figura 3. Resposta imune inata frente à infecção de *Leishmania* spp. Diversos leucócitos participam de maneira sinérgica no estabelecimento de respostas à *Leishmania*. Os neutrófilos figuram entre as primeiras células a migrarem para o sítio infeccioso e conseqüentemente são um dos pioneiros na interação com os parasitos. O desfecho do diálogo entre neutrófilos e *Leishmania* depende de inúmeros fatores, que incluem a espécie do parasita e fatores genéticos do hospedeiro. Tipicamente, neutrófilos infectados passam por um processo de morte programada, apoptose, e são fagocitados por macrófagos. Desta maneira, ocorre a transmissão do parasita para estas células e a inflamação é amplificada. Dependendo da via de ativação macrofágica, sinais imunológicos relacionados com a destruição ou manutenção do parasita são induzidos. As células dendríticas também exercem papel fundamental na imunopatogênese da leishmaniose, sendo decisivas no estabelecimento de respostas imune adquirida contra tal patógeno (Scott & Novais, 2016 – adaptado).

5.2 NEUTRÓFILOS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E FUNÇÃO MICROBICIDA

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) são os leucócitos mais abundante do sistema imune inato, e constituem uma das primeiras linhas de defesa estabelecida nos

contextos de infecção e inflamação (NICOLÁS-ÁVILA; ADROVER; HIDALGO, 2017). Tais células originam-se de células-tronco hematopoiéticas, que também são precursoras de outros inúmeros elementos do sangue (BORREGAARD, 2010). Os neutrófilos, sob a instrução de apropriados fatores de crescimento e estímulos de citocinas, submetem-se a longos e complexos processos de diferenciação celular a fim de dar origem a sua forma funcional. Seus estágios precursores são conhecidos como: mieloblasto, promielócitos, mielócito, metamielócito, e por fim, polimorfonucleares (BORREGAARD, 2010).

Os neutrófilos podem ser distinguidos morfológicamente pela presença de diversos grânulos citoplasmáticos e por seu núcleo multilobulado, que é facilmente corado por corantes histológicos como a hematoxilina (LEY et al., 2018). PMNs são células lábeis, tendo meia-vida com duração de aproximadamente 8-20 horas, e que estão programadas para submeter-se a apoptose (SUMMERS et al., 2010).

Os neutrófilos são especializados no reconhecimento de patógenos que comprometem a integridade homeostática do hospedeiro e devem rapidamente iniciar sua ação microbicida (SEGAL, 2007). O reconhecimento de organismos exógenos é feito principalmente através da interação dos neutrófilos com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), localizados na superfície dos microorganismos (AMULIC et al., 2012; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2013). Para que tal identificação seja possível, os PMNs, assim como outros leucócitos contam com os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (LEY et al., 2018).

A presença de patógenos induz a ativação do arsenal microbicida dos neutrófilos, que culminam em aumentos nas taxas de fagocitose, liberação de grânulos enzimáticos, indução de mecanismos dependentes de oxigênio, ou formação de extensas redes extracelulares, as NETs (BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007). A fagocitose de patógenos é fomentada pela opsonização deste por proteínas do sistema complemento, como as moléculas C3b e C3bi (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003).

Os grânulos citoplasmáticos presente em neutrófilos carregam uma miríade de enzimas com alta capacidade tóxica para patógenos. Os grânulos neutrofilicos podem ser subdivididos de acordo com sua composição, são eles; Grânulos primários (azurofilicos),

Grânulos secundários (ou específicos) e os grânulos terciários (gelationosos) (CIEUTAT et al., 1998; RØRVIG et al., 2013).

Os grânulos azurofílicos são caracterizados por seu grande diâmetro (0,3 μm), seu desenvolvimento pioneiro durante a maturação neutrofílica, e por albergarem principalmente α -defensinas, mieloperoxidasas (MPO) e serina proteases (AMULIC et al., 2012). O mecanismo de atuação das α -defensinas consiste na formação de poros na superfície dos patógenos, permitindo o influxo de diversos componentes do meio externo e subsequente ruptura da homeostase celular destes organismos (BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007; LEHRER; LU, 2012). A MPO atua sob a formação de ácidos, como ácido hipocloroso, que atacam a membrana celular dos organismos invasores (NAUSEEF, 2014). Por fim, tem-se as serinas proteases, tipicamente caracterizadas pelas elastase e proteinase G. A elastase produzida por neutrófilos tem a capacidade de modular a liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α) pelos macrófagos (WILLIAM VANDIVIER et al., 2002). Coletivamente, as serinas proteases exercem influência na ativação de diversas células como as endoteliais e epiteliais, além de outros leucócitos como macrófagos e linfócitos (AMULIC et al., 2012)

Os grânulos secundários possuem substâncias que atuam no sequestro de ferro e que limitam o crescimento bacteriano; são as lactoferrinas. Já os grânulos terciários possuem gelatinases, por exemplo a metaloproteinase-9 (MMP9) que atua sob a matriz extracelular (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003)

Os neutrófilos também são capazes de desencadear eventos de explosão respiratória produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) (SEGAL, 2007). O principal aparato enzimático de geração de ROS é a enzima NADPH oxidase, localizada na membrana de fagolisossomos de neutrófilos. Os produtos da NADPH oxidase são extremamente nocivos a microorganismos, entre tais moléculas destacam-se o peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003). Uma outra alternativa microbicida adotada por neutrófilos é a geração de redes extracelulares, composta por proteínas e cromatina, formando redes fibrosas de DNA – as NETs (neutrophil extracellular traps) (AMULIC et al., 2012; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2013).

5.3 O PROCESSO DE ATIVAÇÃO NEUTROFÍLICA

Durante condições homeostáticas, os neutrófilos circulam na corrente sanguínea, através dos vasos e capilares, em um estado conhecido como quiescente – no qual a maquinaria de destruição de patógenos encontra-se desativada (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2013). Estes neutrófilos circulantes são capazes de notar a presença de sinais inflamatórios, liberados pela atividade dos microorganismos ou pelo dano tecidual no foco da infecção (BORREGAARD, 2010). Mediante a identificação de padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs) e alterações nos gradientes quimiotáticos, tais neutrófilos iniciam o processo de migração através dos vasos sanguíneos acessando o sítio inflamatório (MANTOVANI; CASSATELLA; COSTANTINI, 2011).

Na presença dos estimulantes apropriados, como LPS, TNF, IL-17, entre outros, as células endoteliais disparam a síntese de moléculas de adesão na região luminal dos vasos sanguíneos (AMULIC et al., 2012). Entre essas moléculas, destacam-se as P – e E – selectinas, glicoproteínas transmembranosas de cadeia única, que estão associadas aderência celular (MULLER, 2013)

Por sua vez, os neutrófilos devem ser capazes de reconhecer os padrões associados à inflamação recém-produzidos pelas células endoteliais, e o fazem por intermédio de duas moléculas constitutivamente expressas em sua superfície: a PSGL-1 e L-selectinas (MULLER, 2013). O contato físico direto estabelecido entre as P- e E- selectinas das células endoteliais e as L-selectinas de neutrófilos caracteriza a etapa inicial de migração neutrofílica, coletivamente reconhecidos como eventos de captura dos neutrófilos pelas células endoteliais (WOODFIN; VOISIN; NOURSHARGH, 2010). As alterações internas do neutrófilo culminam nos eventos de aderência firme, mediados por proteínas especiais – as integrinas – como a LFA -1 (“lymphocyte fuction associated antigen 1”) e MAC-1 (“macrophage 1 antigen”) (WAGNER; ROTH, 2000). Uma vez aderido à membrana basal, os neutrófilos se encontram em um meio repleto de compostos proteicos, como moléculas de laminina e colágeno tipo IV, que podem estar envolvidos no processo de ativação (LEY et al., 2007). De maneira geral, a cascata migratória dos neutrófilos envolvem os eventos de captura, rolamento, adesão, rastejamento e diapedese. A execução sequencial desses eventos culmina na passagem do neutrófilo para o sítio de inflamação. Subsequentemente, ocorre a ativação de várias vias bioquímicas que irão determinar o comprometimento do neutrófilo com a eliminação do patógenos. Quando

ultrapassada a barreira de células endoteliais, os neutrófilos alcançam o estado ativado e subsequentemente iniciam a sua programação microbicida como a fagocitose, degranulação, geração de ROS e NETs (eventos já descritos aqui) (LEY et al., 2007) (figura 4).

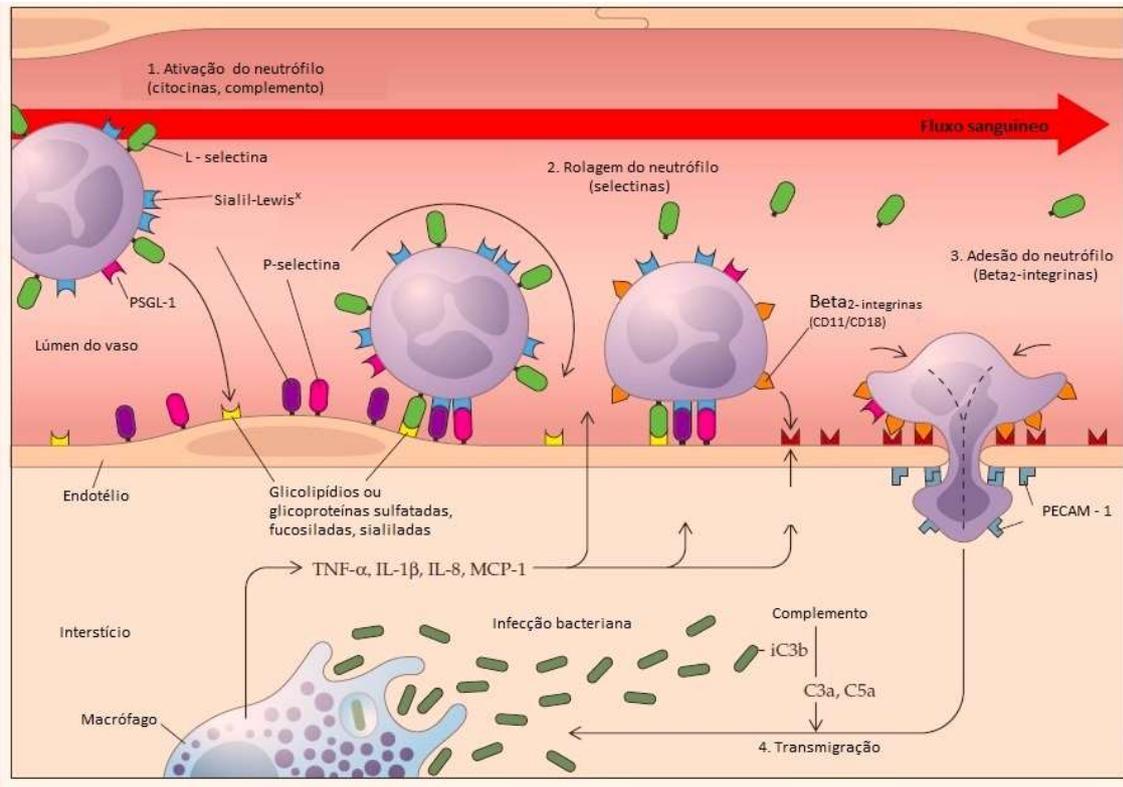


Figura 4. Os Processos de recrutamento e ativação de neutrófilos. Estímulos provenientes de processos inflamatórios promovem a passagem dos neutrófilos circulantes para o sítio de inflamação. Inicialmente, as selectinas permitem a associação dos neutrófilos com as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, caracterizando a etapa de rolamento. Posteriormente, as integrinas permitem a adesão e rastreamento destas células sobre a parede dos vasos. Alterações funcionais e estruturais são induzidas nos neutrófilos por intermédio de fatores liberados pelas células endoteliais. Por fim, os neutrófilos ganham acesso ao sítio de inflamação através de eventos de transmigração induzidos por gradiente de elementos quimiotáticos.

(adaptada de: <http://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acpmedicine/5797/sepse.ht>)

5.4 IMUNOBIOLOGIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas (DCs) destacam-se como um grupo de células com notória capacidade de apresentação de antígenos, sendo assim fundamentais na indução de respostas imunológicas e tolerância (STEINMAN, 2007). Durante a ocorrência de eventos inflamatórios, as células dendríticas são responsáveis pela conexão entre os eixos inato e adaptativo das respostas imunológicas. Embora tenham grande relevância imunológica, as DCs não constituem um grupo homogêneo e são classificadas de acordo com critérios como localização tecidual, expressão de determinadas proteínas de superfície e função imune (COLLIN, 2018).

As populações de células-tronco residentes na medula óssea são os precursores de todos os subtipos de DCs. Inicialmente, as células-tronco hematopoéticas diferenciam-se em progenitores de granulócitos-macrófagos (PGM) ou em progenitores multi-linfóides (PML) que dão origem aos vários estágios existentes na ontogenia das DCs. Os principais subtipos de DCs envolvem as DCs mieloides ou convencionais, as plasmacitoídes, Células de Langerham, e as células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) (COLLIN, 2018).

Como descrito nas sessões anteriores, os monócitos constituem um grupo de células mononucleares fagocíticas com grande plasticidade fenotípica que podem dar origem a células dendríticas e macrófagos (SPRANGERS; VRIES; EVERTS, 2016). Os monócitos humanos são células circulantes no sangue periférico e suas subpopulações são caracterizadas principalmente pela expressão superficial de CD14 e CD16. Em resposta a estímulos inflamatórios, os monócitos circulantes invadem os tecidos e passam por um processo de diferenciação em moDCs (SPRANGERS; VRIES; EVERTS, 2016). Dados presentes na literatura dão suporte à ideia de que diferenciação *in vitro* de monócitos na presença dos fatores de crescimento GM-CSF e IL-4 também culmina na formação tais células dendríticas (HANIFFA; BIGLEY; COLLIN, 2015). Inicialmente, as células dendríticas encontram-se em um estado imaturo reconhecido pela grande capacidade de captura de antígeno e pela baixa expressão de MHC I e II, assim como moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 (FEIJÓ et al., 2016; HOFFMANN, 2004). Quando as DCs reconhecem e capturam antígenos, elas passam por um processo de maturação que culmina na aquisição de um fenótipo especializado para a apresentação de antígenos para os linfócitos T. Este processo de maturação é caracterizado pelo aumento

da capacidade migratória para os linfonodos e pela expressão de citocinas e moléculas de superfície que promovem a ativação e proliferação de linfócitos (MOLL, 2003). As células dendríticas podem ter sua maturação alterada quando infectadas por patógenos (GHOSH; BANDYOPADHYAY, 2004). Já foi demonstrado que a diferenciação na presença de *Leishmania amazonensis* reduz a expressão de CD80, CD1a e a produção de IL-6 por células dendríticas. Além disso, essas células não foram capazes de ativar adequadamente linfócitos T autólogos (FAVALI et al., 2007). Alterações na expressão de moléculas co-estimulatórias de células dendríticas foram descritas em infecções por *P. falciparum* (XHO et al., 1999) e redução na produção de IL-12 e IFN- γ foram observadas nas culturas com *Brugia malayi* microfilaria (SEMNANI et al., 2001).

Depois de passar por processos moleculares que culminam em sua maturação, as células dendríticas estão prontas para a apresentação de antígenos. A interação entre DCs, portando fragmentos de antígenos, e células T naïve culmina na diferenciação destas últimas em dois subtipos principais: as células Th1 e Th2 (KAPSENBERG, 2003). Sabe-se que esta dicotomia é uma representação bastante simplória da diversidade dos subtipos de células T em contextos biológicos. Tipicamente no contexto de infecção por *Leishmania* sp, as células Th1 são responsáveis pela produção de citocinas que se encaixam em um perfil pró-inflamatório como TNF- α e IFN- γ , que agem sinergicamente para conferir proteção contra tais parasitos. A principal característica da atividade leishmanicida de IFN- γ é a polarização clássica de macrófagos produtores de ROS e capazes de eliminar parasitas intracelulares (LIU; UZONNA, 2012). Por outro lado, o perfil Th2 é reconhecido pela produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-13, que promovem a ativação alternativa de macrófagos com subsequente aumento da proliferação parasitária (LIU; UZONNA, 2012). Ademais, estudos recentes apontaram a participação de outro subtipo especial de células T durante os eventos de infecção por *Leishmania* sp. Dentre eles, destacam-se os linfócitos Th17 (produtores de IL-17 e responsáveis pelo aumento da migração de neutrófilos) e as células T reguladoras (produtoras de IL-10 e TGF- β que conferem reduzidas taxas de eliminação parasitária) (EHRlich et al., 2014; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE et al., 2017) (figura 5).

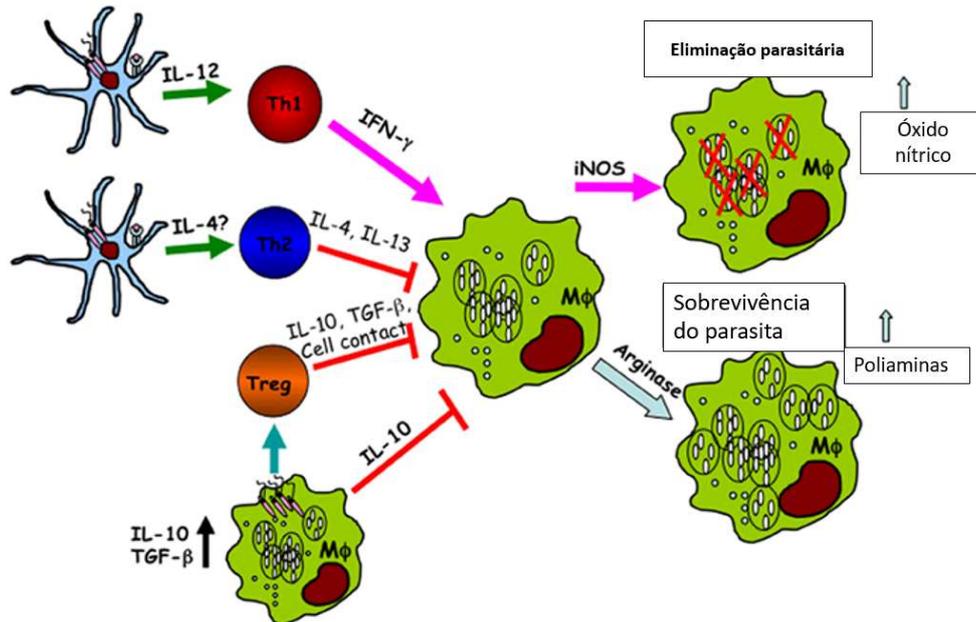


Figura 5 – Regulação exercida por células dendríticas e macrófagos sob a infecção por *Leishmania* sp. Durante o estabelecimento da infecção, células dendríticas e macrófagos reconhecem o parasita e orquestram diversos mecanismos que definem o desfecho da infecção. Uma das principais respostas destas células é a fagocitose de tal protozoário. Células dendríticas infectadas produzem IL-12, citocina que instrui a diferenciação e proliferação de células Th1, que por sua vez liberam copiosas quantidade de INF- γ . Esta citocina tem relevância substancial na ativação clássica de macrófagos caracterizada pela expressão de iNOS, produção de NO e subsequente destruição do parasita. Alternativamente, sob certas circunstâncias, as células dendríticas infectadas podem favorecer a expansão de células Th2 que secretam citocinas de caráter anti-inflamatório IL-4 e IL13. Assim, ocorre a ativação alternativa dos macrófagos, reconhecida pelo aumento da atividade da arginase e sobrevivência de *Leishmania* sp. Além dos mecanismos de regulação já descritos, macrófagos infectados podem produzir IL-10 e TGF- β em quantidades necessárias para a expansão de células T regulatórias. Estas, por conseguinte, orquestram eventos de imunoregulação com subsequente mitigação das respostas contra o parasito. (adaptado de Dong e Jude, 2012).

5.5- COMUNICAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS

Dados presentes na literatura sugerem que células dendríticas são capazes de interagir com outros tipos celulares e que o desfecho deste diálogo imunológico pode modular as atividades biológicas das células dendríticas (BREEDVELD et al., 2017). Sabe-se que neutrófilos ativados são capazes de modular os eixos inato e adaptativo da resposta imune através de inúmeros mecanismos (LELIEFELD; KOENDERMAN;

PILLAY, 2015). Levando em consideração que neutrófilos e células dendríticas estão co-localizados no sítio inflamatório, a sua interação é de suma importância para a compreensão de processos patológicos. No contexto de infecção causadas por protozoários, já foi demonstrado que RANTES, MIP-3, IL-12 e TNF- α liberados por neutrófilos estimulados com *T gondii* induzem o recrutamento e a maturação de células dendríticas, aumentando a expressão de CD80, CD86 e CD40 essencial para a interação com células T (BENNOUNA e col, 2003). De maneira similar, o controle da infecção causada por *Leishmania* está relacionado a uma resposta efetora de células T, que são sensibilizadas por células dendríticas, sendo caracterizada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

A interação física entre neutrófilos e células dendríticas ocorre por intermédio de receptores localizados na membrana celular destes dois tipos de leucócitos. Estes receptores são o MAC-1 (macrophage – antigen 1) dos neutrófilos e o DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) das células dendríticas (GISBERGEN e col, 2005; MEGIONAVI e col, 2006). O DC-SIGN é uma proteína que faz parte da família das C-Lectinas e que possui grande afinidade pela molécula ICAM3 (GARCIA-VALLEJO; VAN KOOYK, 2013). Além de mediar a interação das células dendríticas com outros diversos tipos celulares, o DC-SIGN também possui relevante função na ligação das DCs a patógenos, através do reconhecimento de domínios de glicoproteínas que exibem grandes quantidades de manose (BROWN; WILLMENT; WHITEHEAD, 2018). Estudos pioneiros de Yvette van Kooyk e seu grupo, demonstraram a importância do DC-SIGN na interação com neutrófilos, e no processo de maturação de células dendríticas (VAN GISBERGEN et al., 2005). Dados na literatura demonstram que camundongos depletados de neutrófilos e infectados com *L donovani* apresentam um aumento na carga parasitária do baço e fígado associado com aumento da secreção de IL-4 e IL-10 e uma redução da secreção de IFN- γ por células T (McFARLANE e col, 2007).

Desta forma o esclarecimento da participação inicial de neutrófilos humanos ativadas na regulação da infecção de células dendríticas por *Leishmania* bem como na posterior resposta linfocitária são de extrema importância para possibilitar o entendimento de mecanismos imunopatogênicos que determinam a resposta imune adquirida bem-sucedida no contexto dessa importante parasitose.

6 JUSTIFICATIVA

A importância da comunicação entre diferentes tipos de leucócitos no contexto de infecção por *Leishmania sp* tem sido alvo de extensa investigação. Sabe-se que neutrófilos são capazes de interagir com outras células do sistema imune inato, como as células dendríticas, que são decisivas no estabelecimento da resposta imune adquirida. Contudo, pouco se sabe acerca do papel dos neutrófilos ativados na modulação de respostas imunes de células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*. Frente a isso, faz-se importante a investigação dos efeitos da interação entre esses dois tipos celulares no contexto de infecção por tal parasita. Desta maneira, os resultados do presente trabalho contribuem para a identificação dos mecanismos de controle da infecção e compreensão da imunopatogênese da leishmaniose.

7 HIPÓTESE

Neutrófilos humanos contribuem para o controle da infecção de *L. amazonensis* em células dendríticas.

8 OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos empregados por neutrófilos humanos no controle da infecção por *L. amazonensis* em células dendríticas.

8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Investigar a contribuição dos neutrófilos humanos no controle das taxas de infecção e carga parasitária em células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*.
- II. Avaliar os efeitos da interação entre neutrófilos e células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* no perfil de produção de citocinas e mediadores lipídicos relacionados ao controle da infecção.
- III. Investigar a relevância dos neutrófilos na maturação de células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*.

Os experimentos foram realizados no Laboratório Interação Parasito-Hospedeiro e epidemiologia, Laiphe do Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ Bahia.

CULTIVO DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

A cepa MHOM/BR/00/BA125 foi utilizada para infecção das células dendríticas. Promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio de cultura Schneider (Sigma Aldrich, St Louis, MO®), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Cripion), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich, St Louis, MO®), em estufa a 24 °C. Durante o período de cultura, as promastigotas foram contadas, na câmara de Neubauer com uma diluição de 100x em salina, a fim de mensurar a dinâmica de crescimento do parasita. Em todos os experimentos foram utilizadas *Leishmania amazonensis* metacíclicas em fase estacionária.

OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS

Os monócitos foram obtidos a partir do sangue periférico de doadores saudáveis do Hemocentro do Estado da Bahia (HEMOBA). O sangue foi diluído em salina (1:1) e processado, utilizando-se o gradiente de separação HISTOPAQUE® 1077 (Sigma Aldrich, St Louis, MO) por 30 minutos a 360xg em temperatura ambiente. Após a centrifugação, forma-se um anel composto por células mononucleares que foi coletado e lavado 3 vezes com salina a 4°C em 200xg. Para diferenciação em células dendríticas, as células mononucleares passaram por coluna de separação magnética para isolamento de células CD14⁺ (monócitos). Estas células CD14⁺ foram cultivadas por 7 dias na concentração de 1x10⁶/mL em meio completo na presença de IL-4 (100UI/mL) e GM-CSF (50ng/mL; ambos da PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) em placa de 24 poços. A cada 3 dias de cultura, 500 µL de meio contendo os fatores de crescimento eram removidos e substituídos pela mesma quantidade de meio fresco.

INFECÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS POR *L. AMAZONENSIS*

Como descrito anteriormente, promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária foram utilizadas para a infecção *in vitro* de células dendríticas humanas. Os ensaios de infecção foram realizados na proporção de 10 parasitas para cada célula dendrítica (10:1) em meio de cultura completo a 37°C, 5% CO₂ por 24 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas duas vezes com salina a 100xg a fim de remover os parasitas não internalizados.

OBTENÇÃO E CULTURA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Os neutrófilos foram obtidos a partir do sangue periférico de doadores saudáveis do Hemocentro do Estado da Bahia (HEMOBA). O sangue foi processado utilizando-se o gradiente de separação Polymorphprep, conforme instruções do fabricante (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Noruega). Em resumo, o sangue e o gradiente foram centrifugados por 45 minutos a 300xg a temperatura ambiente. Após a centrifugação, duas regiões são observadas: a primeira (mais superficial), constituída por células mononucleares e a segunda formada por polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Em seguida, os neutrófilos foram coletados e lavados três vezes com salina (NaCl a 0.9%) a 4°C por 10 minutos a 200xg, sendo a primeira lavagem, feita com salina a 0.45% para hidratar as células. Após a lavagem, foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer, com uma diluição final de 100x no corante Azul de Tripán. As células foram ressuspensas na concentração de 5×10^5 /mL e cultivadas a 37° C, em 5% de CO₂, em meio RPMI-1640 (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100µ/mL de estreptomicina (meio completo) (Gibco Invitrogen Corporation) para cultivo em placa de 96 poços (Corning Incorporation, Costar, NY, USA).

ATIVAÇÃO IN VITRO DOS NEUTRÓFILOS COM FIBRONECTINA

A ativação de neutrófilos foi induzida pela exposição das células às superfícies da placa de cultura recobertas pelas proteínas da matriz extracelular fibronectina. Resumidamente,

as placas de cultura de 96 poços estéreis (Corning Incorporation, Costar, NY, USA) foram previamente recobertas com 50µl de uma solução de colágeno a 300µg/ml (BD pharmingem, San Diego, CA) e incubados por 12 horas a 4 °C. Para aumentar a ligação da fibronectina aos poços da placa, 100µl de uma solução de 10µg/ml dessa proteína (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) foi adicionada aos poços previamente cobertos com colágeno por 1 hora a 37°C. Após a sensibilização com a fibronectina, os poços foram lavados três vezes com salina e 2×10^6 neutrófilos em meio RPMI foram adicionados em cada poço e incubados por 1 hora a 37°C e 5% CO₂. Após a incubação com as proteínas de matriz, os neutrófilos foram coletados e centrifugados com salina por 100xg 10 minutos a 4°C. Em seguida foram contados e usados nas co-culturas com células dendríticas infectadas.

CO-CULTURA CÉLULAS DENDRÍTICAS - NEUTRÓFILOS ATIVADOS

Células dendríticas infectadas foram co-incubadas com neutrófilos pré- ativados com fibronectina em meio RPMI suplementado com 2 mM/mL de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) por 4, 12 ou 18 horas. Nos experimentos de interação de neutrófilos e células dendríticas infectadas com *L. amazonensis*, utilizou-se a proporção de 5:1 (neutrófilos: células dendríticas). Após estes períodos, os poços foram lavados com salina e as lamínulas fixadas com metanol por 20 minutos e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Para determinar a taxa de infecção das células dendríticas, contou-se 500 células por condição e em duplicata de lamínulas.

TRATAMENTO DE NEUTRÓFILOS COM INIBIDORES ENZIMÁTICOS

Os neutrófilos humanos foram plaqueados na quantidade 5×10^5 por poço, e os grupos experimentais apropriados foram tratados com 10µM inibidores de MPO humana (Abcam,Cambrigde,UK), MMP-9 (Abcam,Cambrigde,UK) ou anticorpo neutralizante da elastase neutrofílica (anti-NE) (r&d systems, Mineapollis, USA).

ENSAIO DE COMPARTIMENTALIZAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS

Células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* foram acomodadas no compartimento inferior de placas Transwell (Sigma Aldrich, St Louis, MO) contendo meio RPMI suplementado com 2 mM/mL de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Paralelamente, neutrófilos humanos ativados foram acomodados na parte superior da placa de Transwell. A co-cultura foi incubada a 37° C por 18 horas. Subsequentemente, as células dendríticas presentes na porção inferior da placa foram coletadas, lavadas com salina e as lamínulas fixadas com metanol por 20 minutos e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Para determinar a taxa de infecção das células dendríticas contou-se 200 células por condição e em duplicata de lamínulas.

TRATAMENTO DOS NEUTRÓFILOS COM INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DE LEUCOTRIENO B₄

Neutrófilos humanos ativados foram plaqueados na quantidade de 5×10^5 células por poço e tratados por 1 hora com 10 µM zileuton (Cayman Chemical Company), a fim de inibir a ação da enzima 5-LOX e conseqüente biossíntese de LTB₄. Posteriormente, os neutrófilos foram centrifugados com salina a 100xg por 10 minutos a 4° C. Então, os neutrófilos pré-tratados com zileuton foram adicionados à cultura de células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*.

ENSAIO DE NEUTRALIZAÇÃO DOS RECEPTORES DC-SIGN E BLT1

Inicialmente, células dendríticas humanas foram infectadas por *L. amazonensis* durante 24 horas em meio RPMI suplementado com 2 mM/mL de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Posteriormente, as células dendríticas foram centrifugadas a 100xg por 10 minutos a 4° C a fim de remover as promastigotas não internalizadas. Por fim, foram adicionados neutrófilos humanos ativados juntamente com 50ng/mL do anticorpo αDC-SIGN (Cayman Chemical Company) ou 5 µM do antagonista BLT1(U-75302, Cayman Chemical Company).

QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS E MEDIADORES LIPÍDICOS

Após os tempos determinados de interação entre neutrófilos ativados e células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*, os sobrenadantes de tais co-culturas foram coletados a fim de se avaliar a produção de citocinas e mediadores lipídicos. Os sobrenadantes foram testados para a presença das interleucinas 1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL10, IL-12p70 e TNF α pelo kit Cytometric Bead Array (CBA, BD Biosciences) conforme instruções do fabricante. Os mediadores lipídicos LTB4 e PGE2 foram quantificados por ELISA de competição de acordo com instruções do fabricante (Cayman Chemical Company, MI, USA).

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

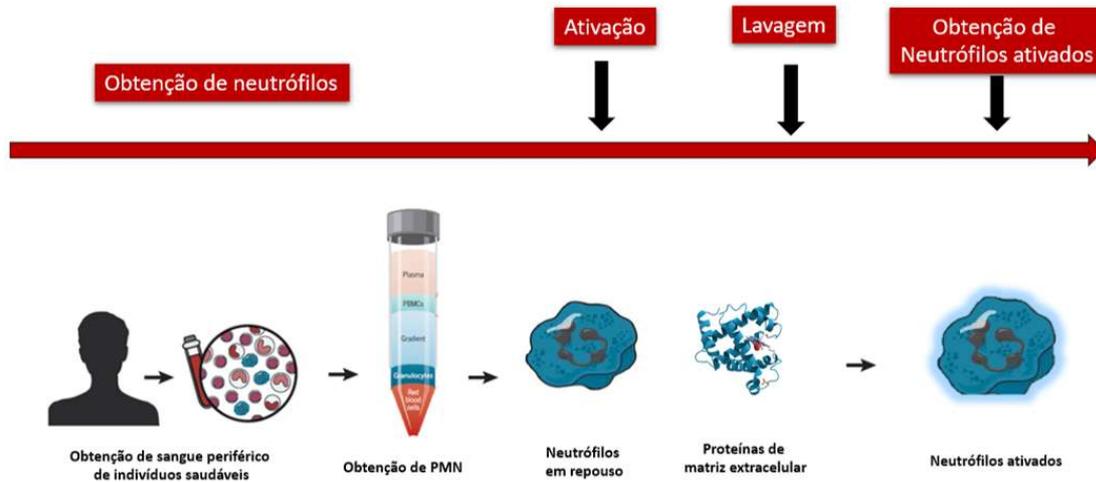
Os níveis de maturação de células dendríticas co-cultivadas com neutrófilos ativados foram mensurados com base na expressão de determinados marcadores de superfície através de citometria de fluxo (LRSFortessa, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Foram utilizados os seguintes anticorpos para a marcação superficial: CD11c (BV605, Biolegend), CD40 (FITC, BD pharmingen), CD86 (PE-CY5, eBIOSCIENCE), CD209 (PE, BD pharmingen), HLA-DR (AF700, Biolegend). O programa FACSDIVA (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) foi utilizado para a aquisição de 50.000 eventos por amostra. Subsequentemente, os dados foram analisados no software Flowjo (TreeStar, Ashland, OR, USA). As frequências de células dendríticas CD11c⁺ expressando CD40, CD209, CD86 e HLA-DR^{high}, assim como a intensidade de fluorescência média das moléculas supracitadas, foram comparadas entre os grupos experimentais.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

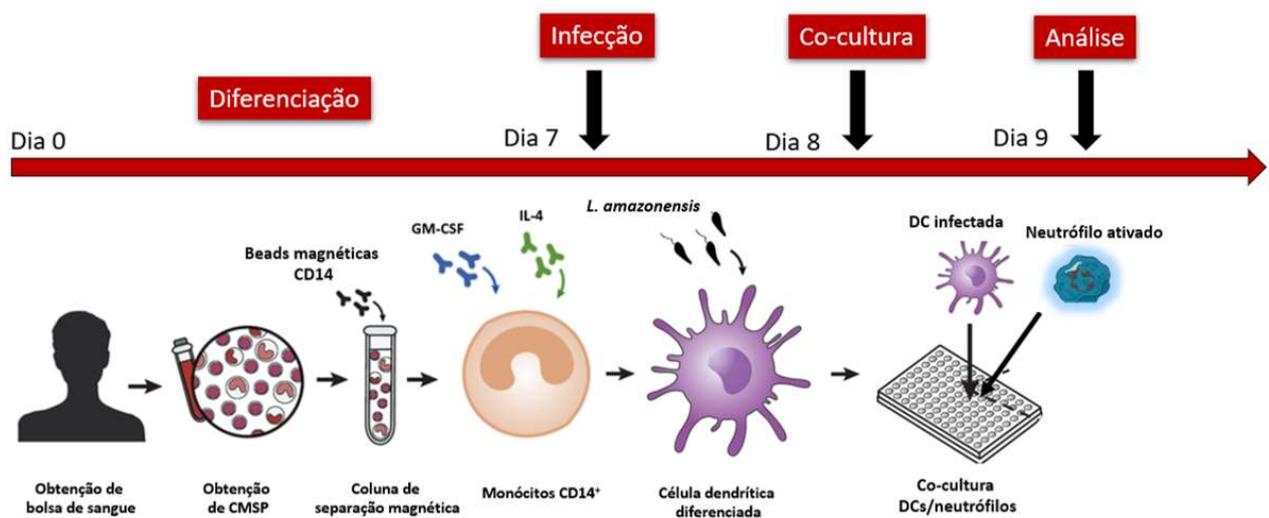
A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa Prism versão 8.0 (GraphPad Software®). Os valores expressos representam as medianas com desvio interquartil obtidas em cada condição. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando o teste kruskal-wallis com pós-teste de Dunn apropriado para dados não paramétricos. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições e valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

10 DESENHOS EXPERIMENTAIS

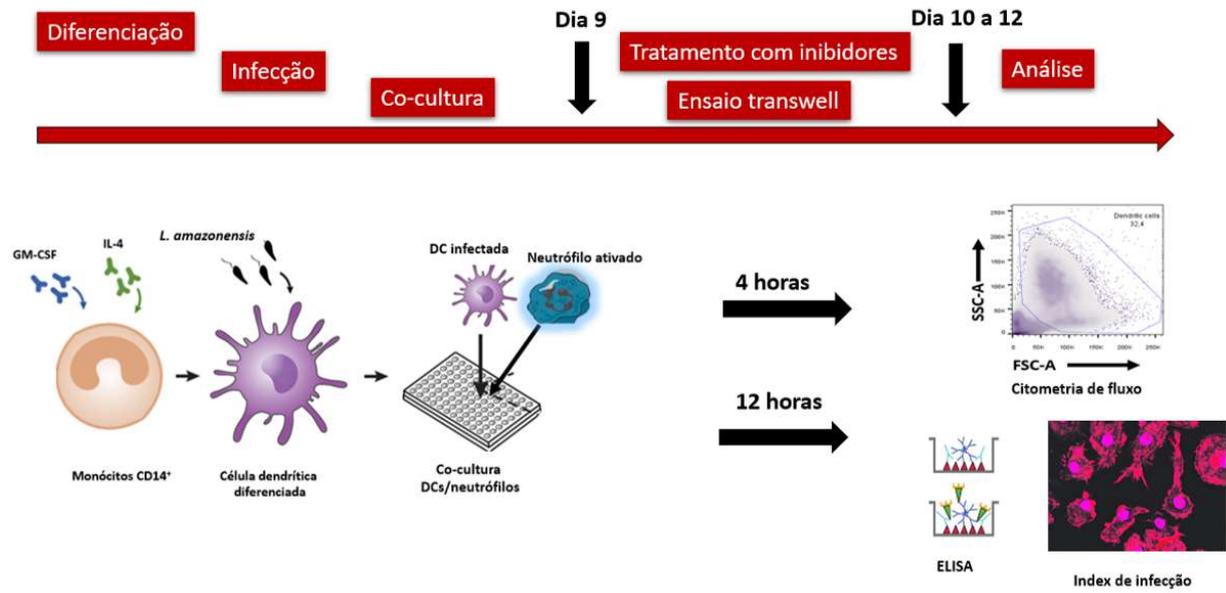
1. Ativação *in vitro* de neutrófilos utilizando proteínas da matriz extracelular.



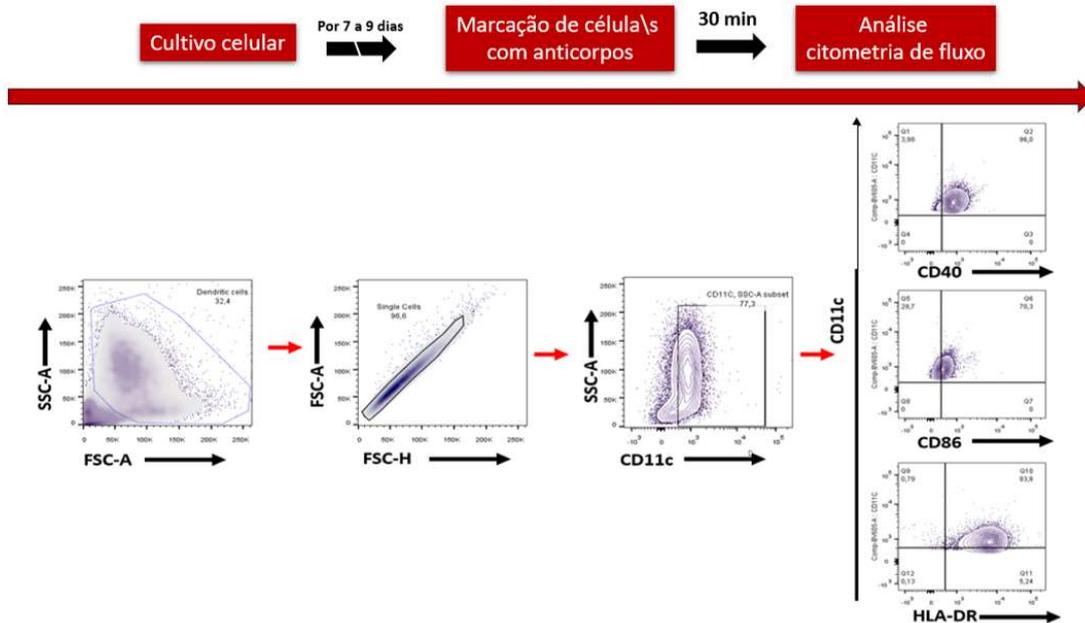
2. Avaliar as taxas de infecção *in vitro* e carga parasitária de Células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* na presença de neutrófilos humanos ativados



3. Investigação do efeito do contato direto entre neutrófilos ativados células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* na maturação e produção de mediadores inflamatórios



4. Estratégia de análise por citometria de fluxo



11.1 NEUTRÓFILOS ATIVADOS E EM REPOUSO SÃO CAPAZES DE RESTRINGIR A INFECÇÃO DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* EM CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Dados presentes na literatura ressaltam a capacidade dos neutrófilos de modular as respostas imunológicas de outros tipos celulares. Portanto, o nosso intuito foi de avaliar o potencial da interação entre neutrófilos ativados e células dendríticas no controle da infecção por *L. amazonensis*. Inicialmente, células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos foram infectadas por *L. amazonensis* pelo período de 24 horas. Decorrido o tempo de infecção, as células dendríticas foram centrifugadas a fim de remover as promastigotas de *L. amazonensis* não internalizadas. Subsequentemente, neutrófilos ativados com fibronectina ou não foram co-cultivados por 12 horas com células dendríticas infectadas. Os efeitos do estado de ativação do neutrófilos sob o desfecho da infecção foram inicialmente analisados a partir da determinação das porcentagens de células dendríticas infectadas e quantidade de amastigotas encontradas. Nota-se que células dendríticas cultivadas com neutrófilos tanto em repouso como ativados obtiveram menores taxas de infecção (Figura 6A) e carga parasitária (número de amastigotas encontradas a cada 100 células) (Figura 6B) quando contrastadas com o grupo experimental não incubado com neutrófilos. Uma vez que foram detectadas diferenças não significantes nas taxas de infecção e carga parasitária entre os grupos que receberam neutrófilos em repouso e ativados, escolheu-se utilizar neutrófilos ativados para a execução dos experimentos subsequentes.

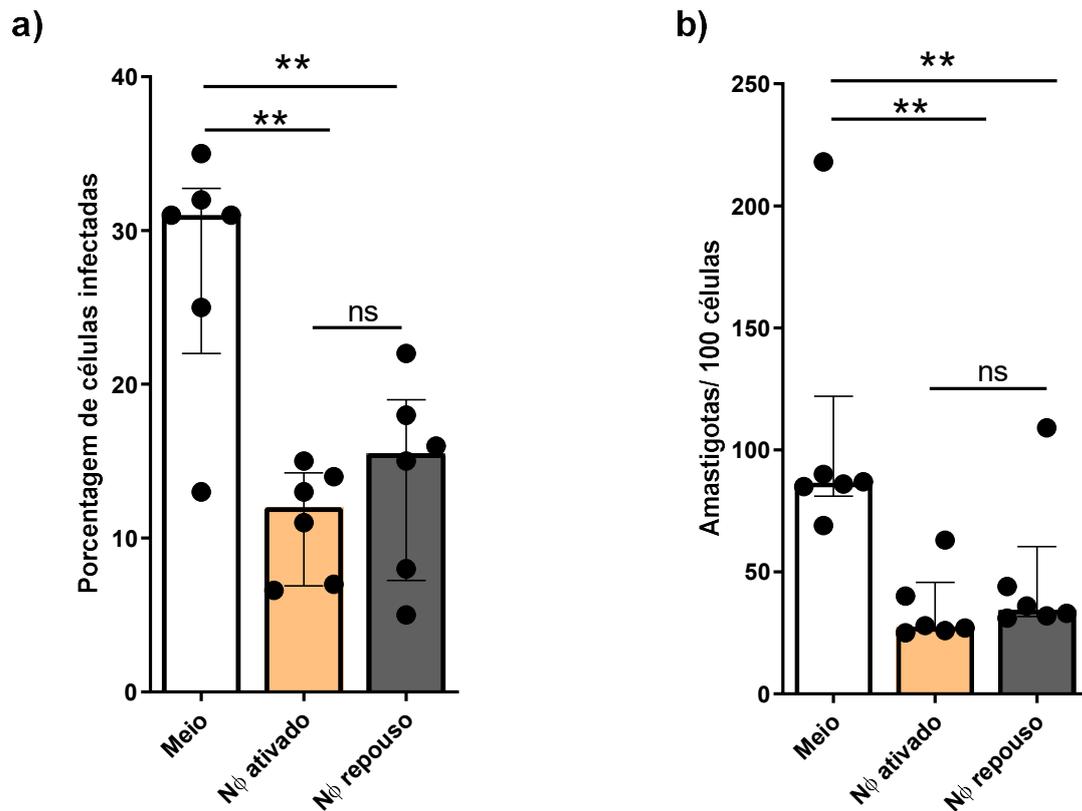


Figura 6. Análise *in vitro* da relevância de neutrófilos no controle das taxas de infecção e carga parasitária de células dendríticas infectadas por *Leishmania amazonensis*. Células dendríticas foram derivadas de monócitos cultivados com IL-4 e GM-CSF por 7 dias. No término deste período, DCs foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitos por célula. Posteriormente, as DCs foram centrifugadas para que os parasitos não internalizados fossem removidos. Então, neutrófilos humanos ativados ou não com fibronectina foram incubados com as DCs pelo período de 12 horas. A) Percentual de células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* e co-cultivadas com neutrófilos em repouso ou ativados. B) Número de amastigotas de *L. amazonensis* em 100 células dendríticas, n = 6. Teste de Kruskal-wallis com pós teste de Dunn. ns (não significante), ** p < 0,01.

11.2 A DEGRANULAÇÃO DE ENZIMAS NEUTROFÍLICAS NÃO CONTRIBUI PARA A ELIMINAÇÃO DOS PARASITAS EM CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS.

Com o objetivo de verificar os possíveis mecanismos envolvidos na redução das taxas de infecção e carga parasitária em células dendríticas infectadas, foram analisados os efeitos da inibição de enzimas produzidas por neutrófilos ativados. Então, células dendríticas foram infectadas por *L. amazonensis* e posteriormente co-cultivadas com neutrófilos humanos ativados na presença dos inibidores ou neutralizantes das seguintes enzimas: Elastase neutrofílica, mieloperoxidase ou metaloproteinase 9. Observou-se que a inibição de tais enzimas não influenciou de maneira significativa as taxas de infecção, uma vez que mediante ao bloqueio farmacológico supracitado, a porcentagem de células infectadas foi similar ao do grupo co-cultivado com neutrófilos ativados e não tratado com neutralizantes (Figura 7A). Além disso, embora tenham sido detectadas diferenças nas atividades enzimáticas de MPO e NE entre os grupos experimentais (Figura 7B), isso não se refletiu na contenção do parasito. Desta maneira, os resultados obtidos apontam que tais enzimas secretadas por neutrófilos ativados não devem participar diretamente no controle da infecção *in vitro* por *L. amazonensis*

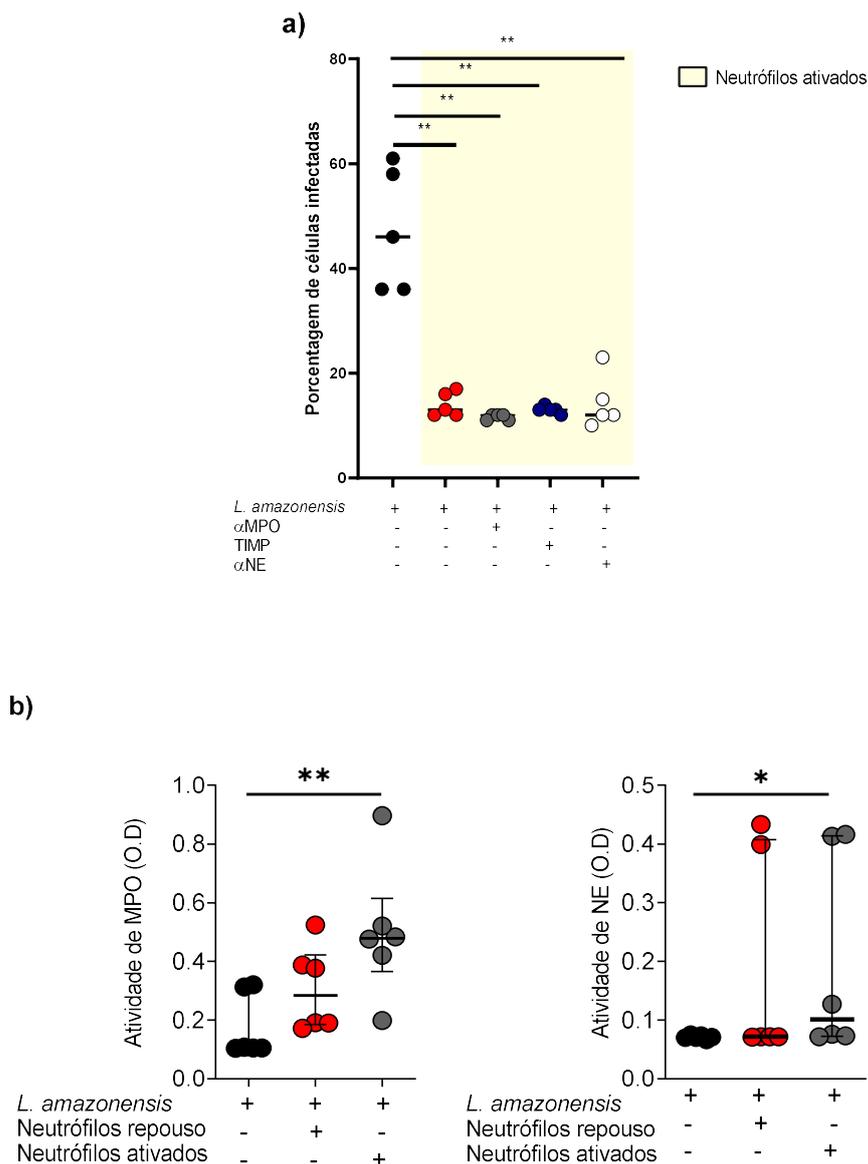


Figura 7-

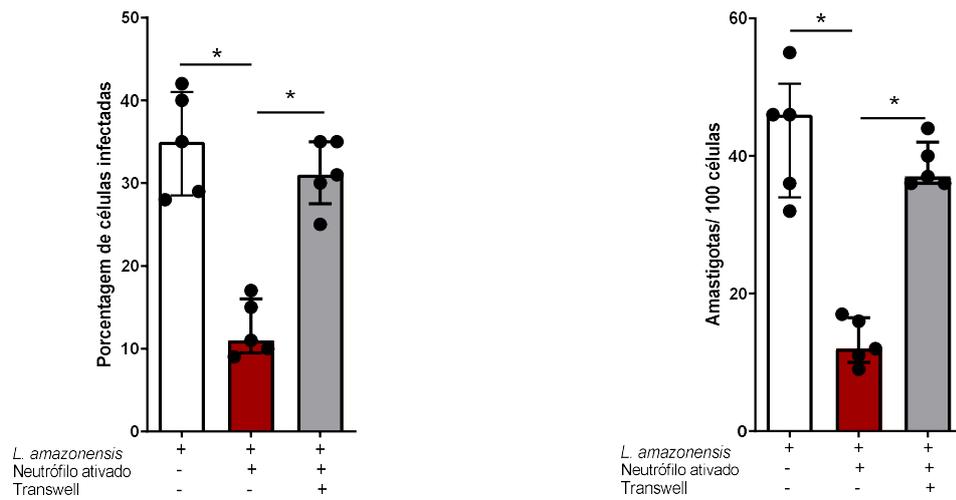
Papel das enzimas neutrofílicas no processo de eliminação parasitária em células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*. Células dendríticas derivadas de monócitos foram infectadas por 24 horas com *L. amazonensis* e posteriormente incubadas com neutrófilos ativados por 12 horas. Os inibidores da mieloperoxidase (α MPO), elastase neutrofílica (α NE) e metaloproteinase 9 (TIMP) foram adicionados à co-cultura. A) Porcentagem de células dendríticas infectadas frente à inibição de enzimas neutrofílicas (MPO, MMP9 e NE) e co-cultivadas com neutrófilos humanos ativados. B) Determinação da atividade enzimática de MPO e NE no sobrenadante fresco da co-cultura de células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* e neutrófilos ativados ou em repouso. n =6. Teste de Kruskal-wallis com pós teste de Dunn., * p < 0,05, ** p < 0,01.

11.3 A ELIMINAÇÃO DO PARASITA DEPENDE DO ESTABELECIMENTO DE CONTATO DIRETO ENTRE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *L. AMAZONENSIS* E NEUTRÓFILOS ATRAVÉS DO DC-SIGN.

Para avaliarmos se o contato direto entre os receptores de neutrófilos e células dendríticas eram capazes de modular o desfecho da infecção por *L. amazonensis*, realizamos o co-cultivo deste dois tipos celulares em placas dispostas de dois compartimentos fisicamente separados por uma membrana semipermeável, que ao mesmo tempo que inviabiliza a interação direta entre estas células, permite a passagem de pequenas moléculas presentes no sobrenadante das culturas (*transwell*). Foi observada somente uma redução nas taxas de infecção e carga parasitária no grupo em que neutrófilos e células dendríticas estavam em contato direto em contraste com o grupo cultivado na placa *Transwell* (figura 8A).

Dados recentes da literatura apontam o envolvimento do DC-SIGN em diversos eventos de adesão celular, sinalização e modulação das respostas imunológicas de células dendríticas frente à infecção por diversos patógenos (GARCIA-VALLEJO; VAN KOOYK, 2013). Desta maneira, o nosso intuito foi de verificar se o DC-SIGN seria o elemento responsável pelo estabelecimento do contato físico entre neutrófilos ativados e células dendríticas, e se tal interação direta teria consequências na susceptibilidade das DCs à *L. amazonensis*. Pode-se observar que a neutralização do DC-SIGN é seguida pela elevação das taxas de infecção e carga parasitária (figura 8B), sendo semelhantes ao grupo controle não co-cultivado com neutrófilos ativados. Nossos resultados demonstraram que mediante o bloqueio do DC-SIGN, as células dendríticas exibiam altos níveis de infecção, albergando um número considerável de amastigotas. Coletivamente, estes resultados sugerem que a interação entre neutrófilos e DCs ocorre de maneira dependente do DC-SIGN conduzindo a uma subsequente eliminação do parasita.

a)



b)

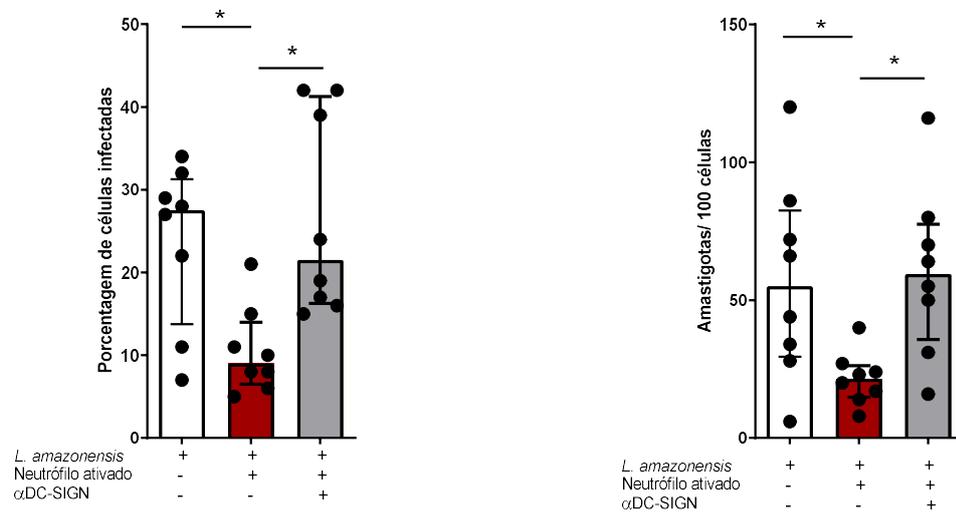


Figura 8- Efeito do contato direto entre células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* e neutrófilos ativados sob as taxas de infecção e carga parasitária. Células dendríticas derivadas de monócitos foram infectadas por 24 horas com *L. amazonensis* e posteriormente incubadas com neutrófilos ativados por 12 horas. A) Taxa de infecção e carga parasitária de células dendríticas em livre contato com neutrófilos ativados ou separadas em diferentes compartimentos na placa de transwell. B) Percentual de células dendríticas infectadas e número de amastigotas de *L. amazonensis* mediante inibição do DC-SIGN. n =5. Teste de Kruskal-wallis com pós teste de Dunn., *p <0,05.

11.4 O CONTROLE DA INFECÇÃO DE *L. AMAZONENSIS* EM CÉLULAS DENDRÍTICAS CULTIVADOS COM NEUTRÓFILOS ATIVADOS OCORRE DE MANEIRA DEPENDENTE DE TNF α .

Dados presentes na literatura corroboram com a noção de que neutrófilos e células dendríticas estabelecem sinapses imunológicas através do DC-SIGN a fim de promover a transferência de moléculas que modulam as respostas imunes de maneira recíproca. Ludwig e colaboradores (2006) propuseram que o diálogo molecular mediado pelo DC-SIGN culmina na liberação de TNF α . Nosso objetivo foi avaliar a relevância do TNF α proveniente da interação entre neutrófilo e células dendrítica no contexto da infecção *in vitro* por *L. amazonensis* (LUDWIG; GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2006). As concentrações de TNF α do sobrenadante da co-cultura de células dendríticas infectadas e neutrófilos ativados frente à inibição farmacológica do DC-SIGN ou não foram quantificadas por ELISA. Verifica-se que a neutralização do DC-SIGN reduz a produção de TNF α se comparado com o grupo controle (não tratado com o anticorpo neutralizante) (Figura 9A). Tal achado sugere que a produção de TNF α esteja diretamente vinculada a disponibilidade de DC-SIGN na superfície de células dendríticas. Posteriormente, tendo em vista o potencial de indução de respostas microbidas do TNF α , avaliamos a relevância de tal citocina no controle da infecção *in vitro*. Nota-se que o bloqueio do TNF α culminou na elevação das taxas de infecção e carga parasitária em proporções similares ao do grupo controle, no qual os neutrófilos ativados estão ausentes (figura 9B). Coletivamente, os dados apontam uma relação de direta proporcionalidade entre o aumento da produção de TNF α mediado pelo DC-SIGN e eliminação do parasito.

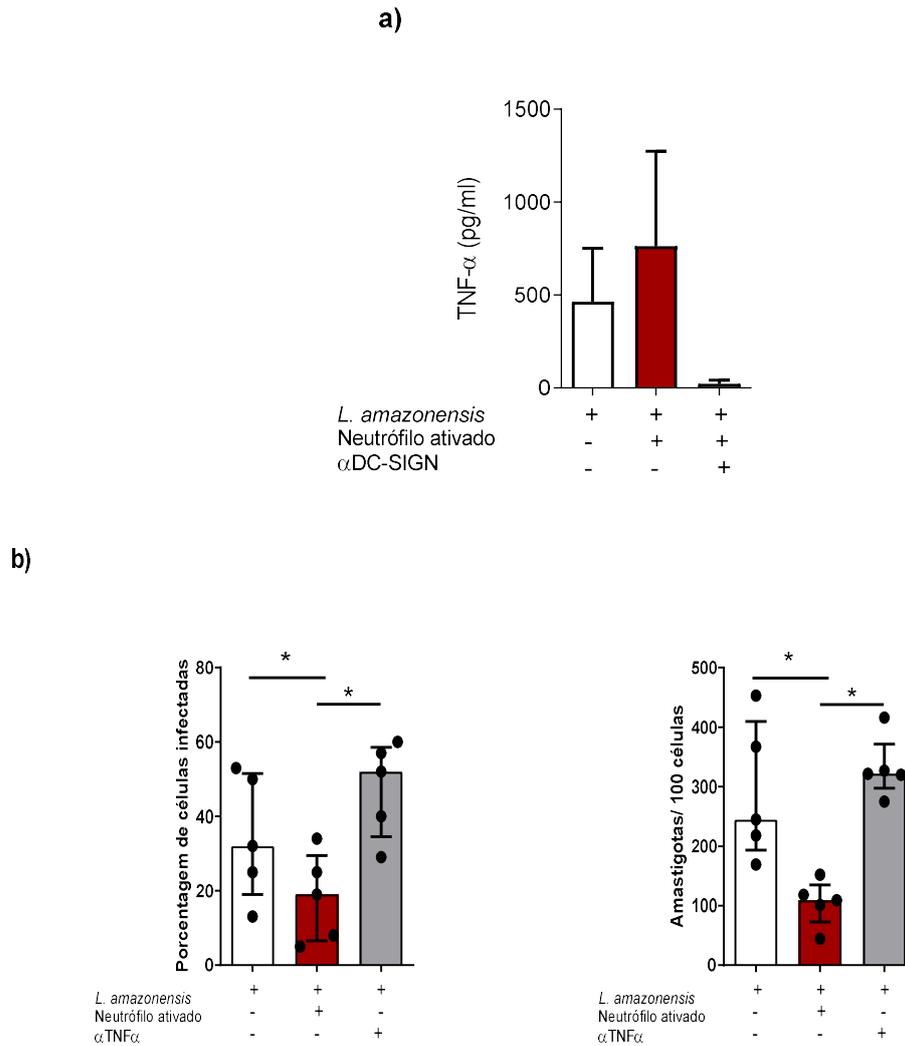


Figura 9- Papel do TNF- α no controle da infecção de *L. amazonensis* em células dendríticas co-cultivadas com neutrófilos humanos ativadas. DCs humanas foram obtidas a partir de células mononucleadas de sangue periférico mediante ao cultivo destas células com IL-4 e GM-CSF por 7 dias. Em seguida, as DCs foram infectadas com *L. amazonensis* por 24 horas na proporção de 10 parasitos/célula. Posteriormente, as DCs foram incubadas a 37°C em placas de 96 poços na ausência ou presença de neutrófilos ativados. A neutralização do TNF α foi realizada com a adição anticorpo neutralizante na concentração de 1 μ g/mL à cultura. A) A Produção de TNF α foi determinada por ELISA do sobrenadante da co-cultura com ou sem a inibição do DC-SIGN. B) Taxas de infecção e carga parasitária em DCs tratadas ou não com o inibidor farmacológico do TNF α . n =5. Teste de Kruskal-wallis com pós teste de Dunn., * p < 0,05.

11.5 A INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS VIA DC-SIGN REGULA A PRODUÇÃO DE MEDIADORES LIPÍDICOS.

Sabe-se que as sinapses imunológicas estabelecidas entre células dendríticas e neutrófilos facilitam a transferência de inúmeros mediadores inflamatórios, dentre eles, os mediadores lipídicos, que figuram como potentes moduladores de respostas imunes. Com o objetivo de melhor entender a participação de mediadores lipídicos na interação neutrófilo – células dendrítica, os níveis de leucotrieno B₄ e Prostaglandina E₂ foram determinados por ELISA dos sobrenadantes das co—culturas após 4 e 12 horas de interação (Figuras 10 A e B). Os resultados evidenciam que após 4 horas de interação celular, os níveis de LTB₄ são reduzidos diante da neutralização do DC-SIGN. Tal fenômeno não é observado na produção de PGE₂ no período de 4 horas, onde obtivemos níveis semelhantes de produção de prostaglandina entre os grupos experimentais (com e sem a adição de αDC-SIGN). Entretanto, após 12 horas de interação, observa-se uma mudança no perfil de mediadores lipídicos presente no sobrenadantes da co-cultura. Nota-se uma redução dos níveis de LTB₄, ao passo que o grupo experimental em que houve contato direto entre as células (sem αDC-SIGN) exibiu um significativo aumento da produção de PGE₂. Os nossos resultados também evidenciam que o predomínio da composição de mediadores lipídicos ocorre de maneira dependente do tempo de interação entre as células. De maneira geral, nossos dados apontam que a produção de eicosonóides nas culturas de DCs infectadas e neutrófilos ativados está vinculada diretamente a disponibilidade do DC-SIGN.

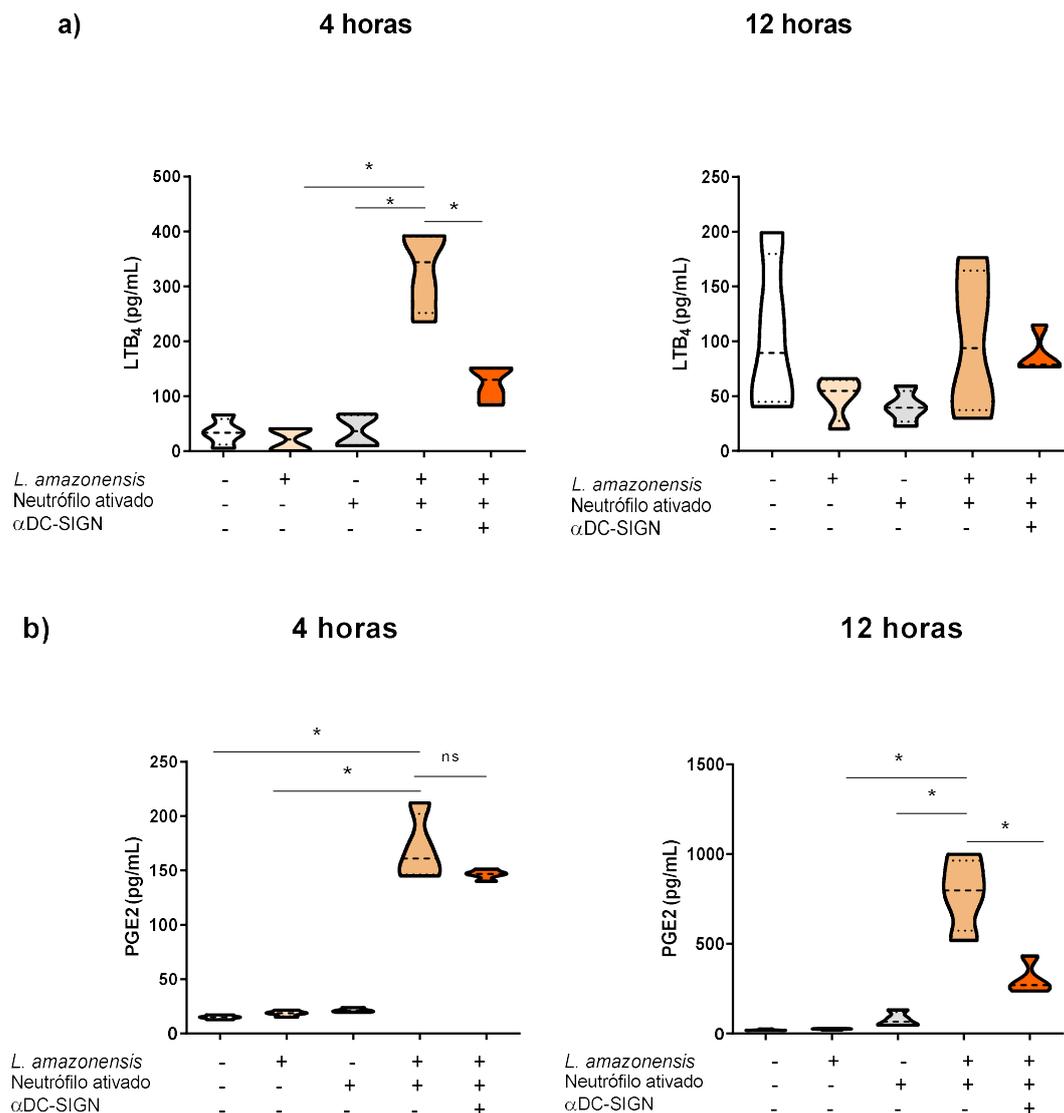


Figura 10- Quantifica33o dos mediadores lip3dicos nos sobrenadantes de neutr3filos ativados cultivados com c3lulas dendr3ticas infectadas. DCs humanas foram obtidas a partir de c3lulas mononucleadas de sangue perif3rico mediante ao cultivo destas c3lulas com IL-4 e GM-CSF por 7 dias. Em seguida, as c3lulas dendr3ticas foram infectadas com *L. amazonensis* por 24 horas na propor33o de 10 parasitos para cada c3lula. Posteriormente, as DCs foram incubadas a 37°C em placas de 96 po3os na aus3ncia ou presen3a de neutr3filos humanos ativados. Determina33o por ensaios imunoenz3micos dos n3veis de LTB₄ (figura 10A) e PGE₂ (figura 10B) no sobrenadante nos tempos de 4 e 12 horas co-cultura. n =4. Teste de Kruskal-wallis com p3s teste de Dunn, *p > 0,05.

11.6 O LEUCOTRIENO B₄ PRODUZIDO ATRAVÉS DA INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS DENDRÍTICAS E NEUTRÓFILOS CONTRIBUI PARA A ELIMINAÇÃO DE *L. AMAZONENSIS*.

Como evidenciado em estudos conduzidos por Morato e colaboradores (2014), o LTB₄ desempenha um papel preponderante na destruição de *Leishmania braziliensis* em macrófagos humanos (MORATO et al., 2014b). Uma vez que macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos compartilham diversas características microbicidas e diante dos nossos achados de maior produção deste leucotrieno nas culturas de DCs e neutrófilos, decidimos verificar a contribuição do LTB₄ no controle da infecção por *L. amazonensis* em células dendríticas. Portanto, foram analisadas as taxas de infecção e carga parasitária mediante ao bloqueio do BLT1 (receptor do LTB₄) ou da inibição de enzimas envolvidas na biossíntese de tal mediador lipídico.

Conforme observado na figura 11, o percentual de células infectadas e número de amastigotas foi superior no grupo experimental em que o receptor BLT1 foi neutralizado no momento da adição do neutrófilos à cultura de células dendríticas infectadas. De maneira similar, quando neutrófilos pré-tratados por 1 hora com Zileuton (inibidor da 5-lipoxigenase, necessária para a síntese de LTB₄) foram cultivados com as DCs infectadas, notou-se uma elevação nas taxas de infecção e carga parasitária. O emprego dessas abordagens distintas foi necessário para compreender como neutrófilos e células dendríticas contribuem distintamente para a produção de LTB₄ e subsequente eliminação parasitária. De maneira geral, os presentes resultados apontam os neutrófilos como a principal fonte de produção do LTB₄ no contexto estudado, assim como sugere a contribuição deste mediador lipídico na destruição do parasito.

A)

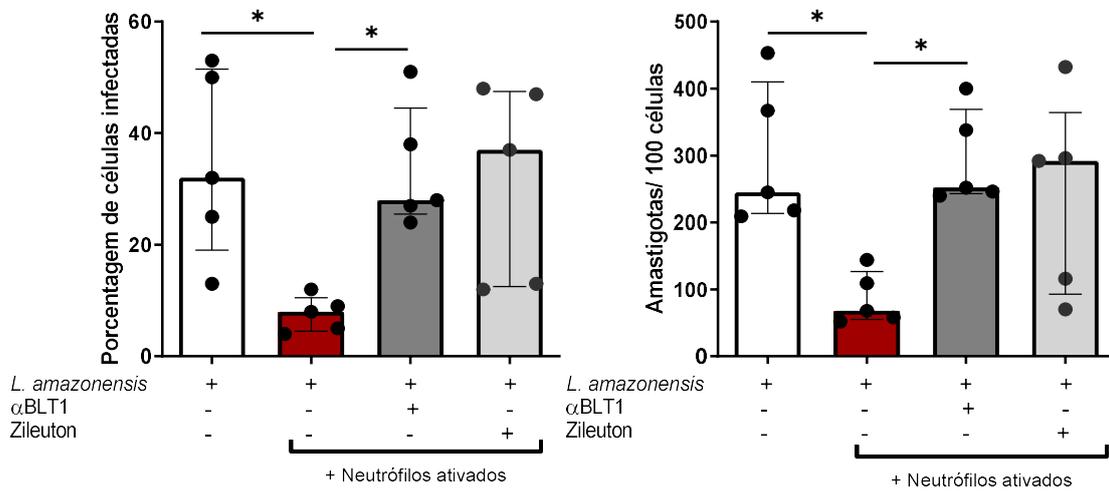
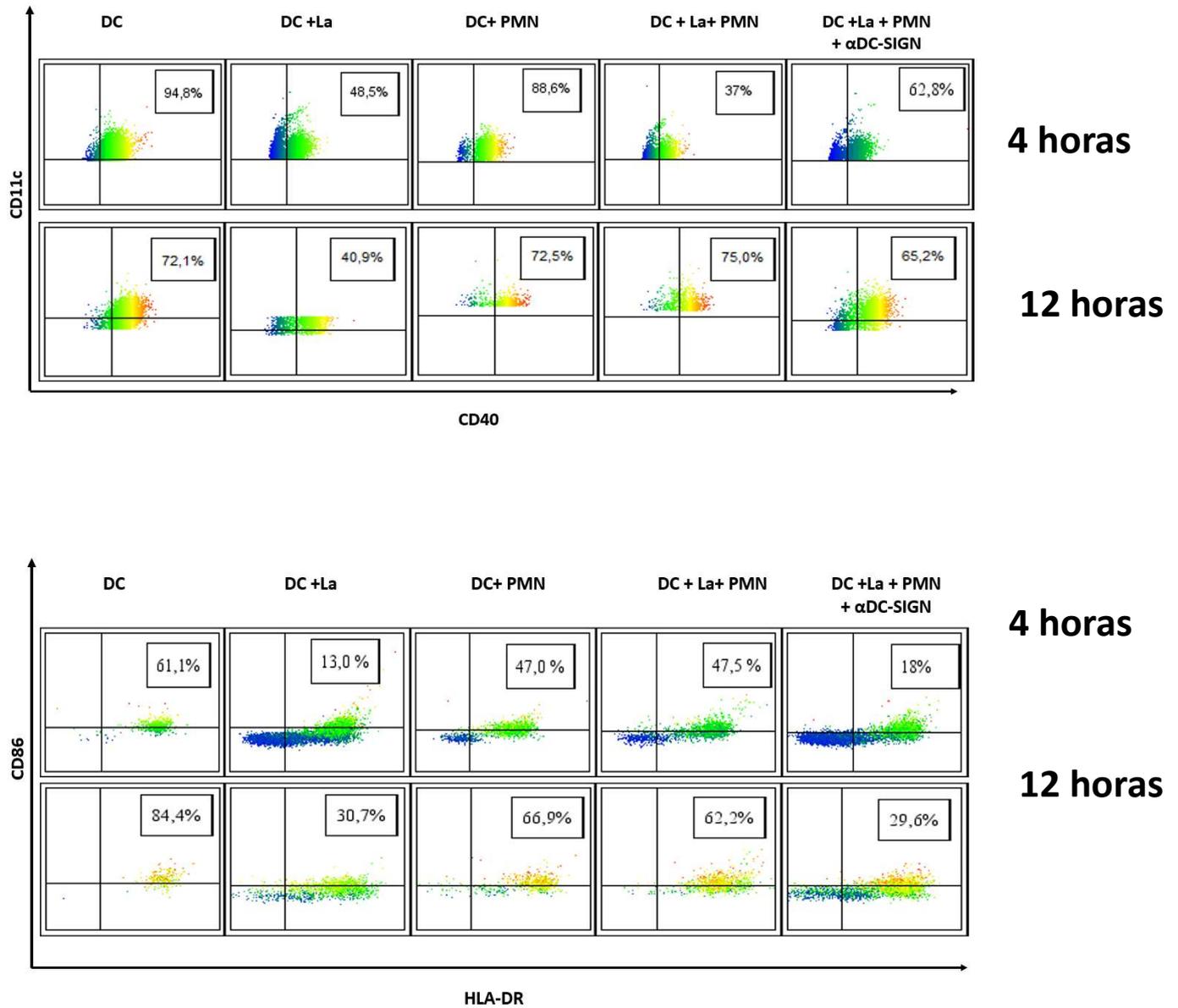


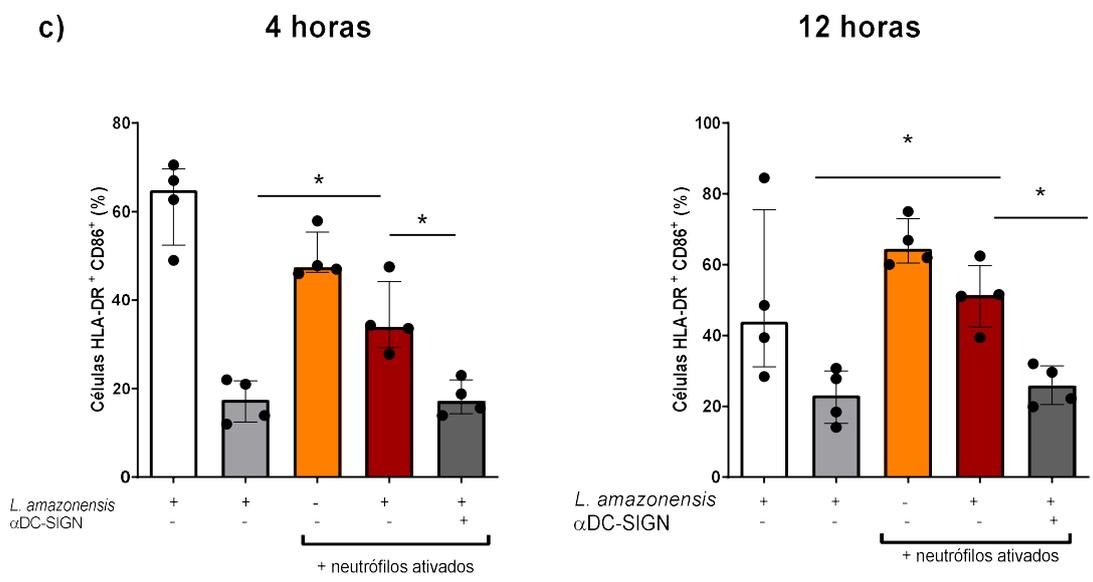
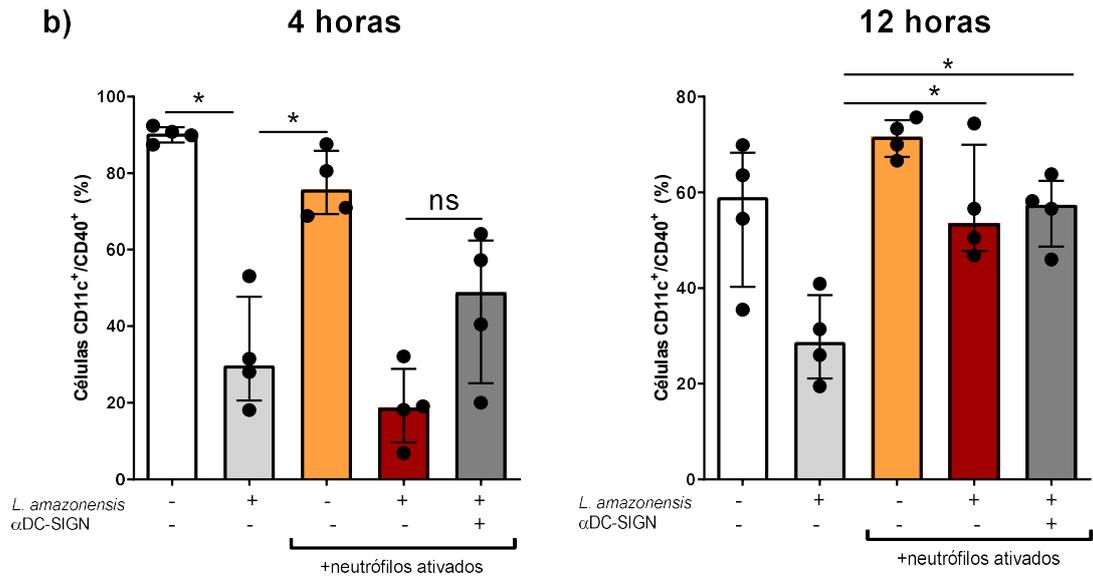
Figura 11- Avaliação do papel do LTB₄ na eliminação do parasita em células dendríticas. Células dendríticas humanas foram infectadas por *L. amazonensis* e posteriormente co-cultivadas com neutrófilos ativados A) Taxas de infecção em células dendríticas tratadas com o inibidor farmacológico do receptor BLT1 ou cultivadas com neutrófilos pré-tratados com zileuton. B) Carga parasitária avaliada nas condições supracitadas. n= 5. Teste de Kruskal-wallis com pós teste de Dunn.

11.7 NEUTRÓFILOS PROMOVEM MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR *L. AMAZONENSIS* DE MANEIRA DEPENDENTE DE DC-SIGN.

Com o objetivo de avaliar como neutrófilos ativados contribuem para a maturação de células dendríticas através da interação via DC-SIGN, analisamos a expressão dos marcadores de superfície CD40, CD86 e HLA-DR. Como demonstrado nas figuras 11 a e b, observa-se que os grupos experimentais que incluíam células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* exibiam menores percentuais de células expressando CD40. Nota-se que a adição de neutrófilos ativados às culturas de células dendríticas infectadas inicialmente não foi capaz de aumentar o número de células dendríticas maduras (tempo de 4 horas de interação). Entretanto, decorridas 12 horas de co-cultura, os níveis de células dendríticas CD40+ aumentaram significativamente, porém de maneira independente do DC-SIGN. No entanto, a análise da expressão de células CD86/HLA-DR + revelou que a adição de neutrófilos ativados foi capaz de promover um aumento no número de células expressando estes marcadores e tal fenômeno ocorreu de maneira dependente da interação mediada por DC-SIGN (Figura 12 c). Esses achados foram similares para os tempos de 4 e 12 horas. A avaliação temporal da intensidade de fluorescência média nas co-culturas revelou que não houve alterações significativas nos níveis de expressão de tais marcadores entre os grupos experimentais tratados e não tratados com o aDC-SIGN. De maneira geral, os nossos resultados apontam para a maior prevalência de células dendríticas maduras diante do engajamento de contato livre e direto com neutrófilos.

a)





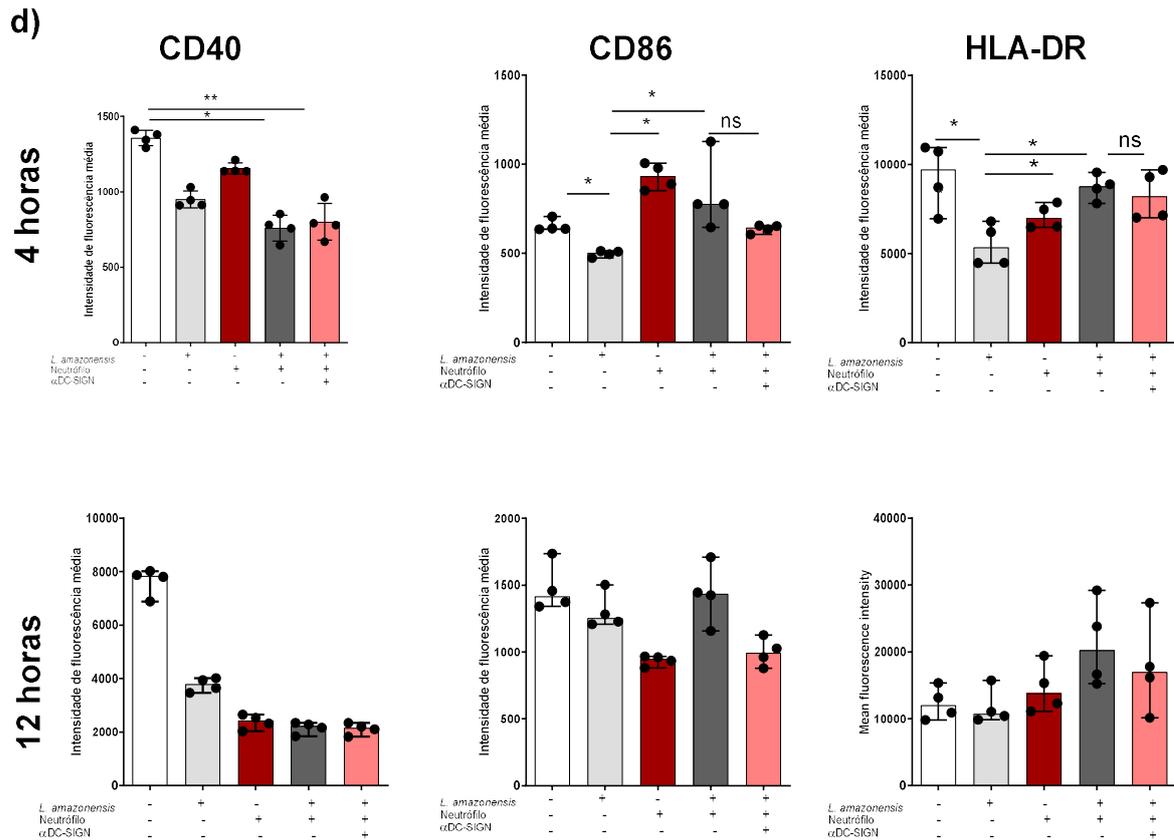


Figura 12 – Determinação dos níveis de maturação de células dendríticas cultivadas com neutrófilos ativadas. Células dendríticas humanas foram infectadas por *L. amazonensis* e posteriormente co-cultivadas com neutrófilos ativados. Após os determinados tempos de interação entre neutrófilos e células dendríticas, a expressão superficial de marcadores associados ao processo maturação foi analisado por citometria de fluxo. A) Painel representativo da citometria de fluxo para identificação de células dendríticas expressando CD40, CD86 e HLA-DR nos tempos de 4 e 12 horas de interação. B) percentual de CD40⁺ C) Percentual de células CD86⁺ HLA-DR⁺ nos tempos de 4 e 12 horas. D) análise da intensidade de fluorescência média de CD40, CD86 e HLA-DR nos determinados tempos. n=4. Teste de Kruskal-wallis com pós teste de Dunn., *p < 0,01; ** p < 0,05.

12 DISCUSSÃO

Durante os estágios iniciais da infecção por *Leishmania* sp, a comunicação entre os leucócitos assume um papel de destaque no desenvolvimento de respostas imune protetoras contra o parasito. Dentre estas células, destacam-se os neutrófilos, células de duração efêmera e que são encontradas abundantemente na circulação. Em condições de infecção e inflamação, o número de neutrófilos circulantes pode aumentar de maneira significativa (KAYE; SCOTT, 2011; MANTOVANI; CASSATELLA; COSTANTINI, 2011). Estudos conduzidos por Peter e colaboradores (2008), demonstraram elegantemente através da combinação de microscopia intravital e citometria de fluxo que há um intenso recrutamento de neutrófilos durante as etapas iniciais da infecção por *Leishmania major* (PETER et al, 2008).

Sob condições homeostáticas, os neutrófilos circulam no interior dos vasos sanguíneos em um estado conhecido como inativado. Ao detectar sinais associados a inflamação, liberados por células residentes do foco infeccioso, os neutrófilos iniciam um complexo processo de migração para ganhar acesso ao sítio de inflamação. Uma vez localizados no tecido inflamado, os neutrófilos iniciam sua função de reconhecimento e fagocitose de microorganismos invasores, assim como a elicitação de outros mecanismos capazes de eliminar patógenos (LEY et al., 2018).. O processo através do qual os neutrófilos deixam o interior dos vasos sanguíneos para chegar ao foco infeccioso é conhecido como diapedese, e é caracterizado pela interação entre os neutrófilos e proteínas que compõe a matriz extracelular (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Uma das consequências de tal interação é a ativação dos neutrófilos que é reconhecida pelo aumento da fagocitose, liberação de grânulos, formação de NETs e aumento na capacidade de estabelecer diálogos moleculares com outras células (MANTOVANI; CASSATELLA; COSTANTINI, 2011). A comunicação estabelecida entre neutrófilos e células dendríticas possui extrema relevância para o curso de infecções, uma vez que as células dendríticas são elementos chave na sensibilização da resposta imune adaptativa (VAN GISBERGEN; GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2005).

Previamente, nosso grupo havia caracterizado um sistema *in vitro* para ativação de neutrófilos através da sua estimulação com diferentes proteínas que compõe a matriz extracelular(Tavares et al, 2016). O perfil fenotipicamente ativado de neutrófilos pode ser

identificado pela análise da liberação de enzimas comumente envolvidas em processos microbicidas (LEY et al., 2018; MANTOVANI; CASSATELLA; COSTANTINI, 2011). Assim, foram quantificadas a produção de MMP-9 e elastase neutrófilica presente no sobrenadante dos neutrófilos ativados com proteínas da matriz extracelular. A MMP-9 faz parte de uma família de enzimas cuja principal função é a degradação da matriz extracelular (DELCLAUX et al., 1996). A elastase neutrófilica é uma serina protease secretada por neutrófilos durante eventos inflamatórios, exercendo um papel fundamental na destruição de patógenos (ALTER; ALTFELD, 2011). Foi observado que a estimulação dos neutrófilos com fibronectina culmina num significativo aumento de secreção de MMP-9 e da atividade da NE, o que não foi encontrado com outras proteínas testadas (TAVARES et al., 2016). A fibronectina é uma proteína tipicamente localizada na superfície de células endoteliais, possuindo substancial relevância nos processos de interação célula-substrato e célula-célula (VERCELLOTTI, 1983). Estudos pioneiros de Vercellotti e colaboradores (1983) demonstraram que a adição de neutrófilos à superfícies recobertas com fibronectina ocasionavam um aumento da adesão de neutrófilos. A maior capacidade de aderência de neutrófilos às células endoteliais por intermédio de fibronectina pode ser um dos mecanismos que favorecem a sua ativação. Assim, em nosso estudo, escolhemos realizar a ativação de neutrófilos humanos através de sua estimulação *in vitro* com fibronectina.

No sítio de inflamação, os neutrófilos ativados dialogam intimamente com outros tipos celulares, como as células dendríticas, e desta forma orquestram as respostas imune inata e adaptativa contra patógenos (AMULIC et al., 2012). As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígenos e importantes elos entre o sistema imune inato e adaptativo. Favalli e colaboradores (2007) demonstraram que *L. amazonensis* é capaz de atenuar as funções de células dendríticas humanas infectadas no modelo de infecção *in vitro* (FAVALI et al., 2007). Outros estudos conduzidos por Bennouna e colaboradores também mostraram a relevância da interação entre neutrófilos ativados e células dendríticas infectadas por *Toxoplasma* sp no processo de maturação das células dendríticas através de mecanismos de secreção local de TNF- α e IL-12. De maneira similar, estudos conduzidos por Vallejo e seu grupo (2018) indicaram que a desregulação da comunicação entre neutrófilos e células dendríticas é capaz de gerar tolerância imunológica durante a infecção por *Plasmodium vivax* (VALLEJO et al., 2018).

Coletivamente, os estudos apontam que a interação entre estes dois tipos celulares possui grande influência no desfecho de infecções por protozoários.

A infecção por *L. amazonensis* mostra um elevado grau de complexidade e o parasita emprega inúmeros mecanismos para subverter as respostas imunes de suas células hospedeiras e promover a sua proliferação (SOONG, 2009). No presente estudo, analisamos os efeitos do contato entre neutrófilos humanos ativado com células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* no curso de tal infecção. Inicialmente, comparamos as taxas de infecção (que compreende o percentual de células dendríticas albergando parasitas intracelulares) e a carga parasitária (número de amastigotas presentes nas células infectadas) na co-cultura de DCs infectadas com neutrófilos humanos em repouso ou ativado (FIGURAS 6 A e B). Nossos dados apontam a importância dos neutrófilos no controle da infecção de *L. amazonensis* em células dendríticas, caracterizado pelas diminuições nas taxas de infecção e carga parasitária. Contudo, o controle exercido pelos neutrófilos aconteceu de modo independente do seu estado de ativação, uma vez que as reduções nas taxas de infecção e carga parasitária foram similares entre os grupos que receberam neutrófilos em repouso e neutrófilos ativado. Outros estudos conduzidos por nosso grupo também salientaram a importância dos neutrófilos na interação com outros tipos celulares. Nesse estudo, Afonso e colaboradores (2008), mostraram que a comunicação entre neutrófilos apoptóticos e macrófagos humanos infectado por *L. amazonensis* culmina no aumento da proliferação do parasita, ao passo que a interação entre estes mesmos macrófagos e neutrófilos necróticos era capaz de conter o crescimento de *L. amazonensis* (AFONSO et al., 2008). Assim, estes resultados estão em consonância com os obtidos no presente estudo, demonstrando que os neutrófilos promovem resistência de outros leucócitos à infecção por *L. amazonensis*. De maneira geral, observamos que neutrófilos viáveis, em repouso ou ativado, contribuem significativamente na contenção do parasita em células dendríticas. Uma vez que, em contextos fisiopatológicos, a maior parte dos neutrófilos encontram-se em estado ativado, optamos por executar os subsequentes experimentos com estes tipos de neutrófilos.

Os neutrófilos albergam grânulos contendo uma grande diversidade de moléculas com função microbicida e são capazes de liberá-los em eventos que sucedem o reconhecimento e interação com patógenos (BORREGAARD, 2010). Os grânulos podem ser classificados de acordo com o seu conteúdo. Os grânulos azurofílicos tem grande

importância nos mecanismos de eliminação de patógenos intracelulares, uma vez que contribuem para a degradação de microorganismos no fagolisossomo (PHAM, 2008). Flores e colaboradores (2017) demonstram experimentalmente que em resposta a infecção pela bactéria periodontal *Peptoanaerobacter stomatis*, neutrófilos promovem exocitose de grânulos azurofílicos associados com a eliminação bacteriana (FLORES et al., 2017). Belaaouj e colaboradores (1998) foram pioneiros na comprovação da importância da elastase neutrofílica na proteção contra bactérias gram-negativas em modelo murino. Além disso, outros estudos apontam o aumento da atividade da mieloperoxidase no plasma de pacientes com sepse sugerindo tal enzima neutrofílica como um marcador da inflamação neste contexto (KOTHARI et al., 2011). Ademais, estudos conduzidos por Reeves e colaboradores em 2002 já apontavam as serina proteases (como elastase neutrofílica e cartepsina G) presentes nos grânulos azurofílicos como protagonistas na eliminação de patógenos intracelulares, em detrimento da participação de ROS para estes fins.

Contudo, no nosso estudo, observamos que o tratamento dos neutrófilos ativados com neutralizantes de enzimas clássicas presentes no momento da degranulação (MPO, NE e MMP-9) não alteraram as cargas parasitárias. A análise de nossos dados nos sugere que tais enzimas não são mediadoras no controle da infecção por *L. amazonensis* no contexto de co-cultivo entre células dendríticas e neutrófilos ativados (figura 7A), apesar da maior atividade enzimática de MPO e MMP-9 nos grupos que receberam neutrófilos ativados (figura 7B). Coletivamente, estes resultados sugerem que embora os neutrófilos ativados exibam maior atividade das enzimas presentes nos grânulos, estas enzimas não são diretamente responsáveis pela diminuição na carga parasitária de células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*.

A literatura reforça que, individualmente, os neutrófilos produzem relativamente baixas quantidades de citocinas e mediadores inflamatórios. Entretanto, em contextos de inflamação, os neutrófilos constituem uma fração apreciável das células presentes, superando em números os outros tipos de leucócitos. Sendo assim, coletivamente, os neutrófilos figuram como uma das principais fontes de citocinas e outros fatores que influenciam no processo de inflamação (JONES et al., 2016). Segundo Novais e colaboradores (2009), macrófagos murinos infectados por *L. braziliensis* aumentam a produção de TNF- α quando co-cultivados com neutrófilos, além disso a secreção local desta citocina está diretamente associada ao controle da infecção. (NOVAIS et al., 2009).

Sabe-se que o estabelecimento de sinapses imunológicas entre neutrófilos e outros leucócitos, assegura a transferência de diversas citocinas, controlando desta maneira a infecção por organismos intracelulares (VAN GISBERGEN; GEIJTENBEEK; VAN KOOYK, 2005).

No nosso estudo, optamos pela utilização da técnica de cultivo células em placas de *transwell* a fim de avaliar se a eliminação do parasita no contexto estudado acontecia via moléculas solúveis presentes no sobrenadante da co-cultura ou se era dependente do contato livre e direto entre as células. Os nossos resultados apontam que a eliminação de *L. amazonensis* em células dendríticas necessita diretamente da interação física com neutrófilos ativados (Figura 8A). Foi evidenciado que as taxas de infecção e carga parasitaria são significativamente reduzidas mediante ao estabelecimento de contato físico direto entre as células dendríticas e neutrófilos. Desta maneira, os dados coletados apontam a relevância do contato direto entre estas células. A interação física entre PMNs e DCs é mediada por receptores de adesão constitutivamente expressos na superfície destas células, MAC-1 e DC-SIGN respectivamente (VAN GISBERGEN et al., 2005). No nosso estudo, avaliamos os efeitos da neutralização do DC-SIGN em células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* e co-cultivadas com PMNs ativados. Houve um aumento significativo nas taxas de infecção nos grupos experimentais tratados com o anticorpo neutralizante do DC-SIGN mesmo na presença de PMN ativados (figura 8B). Assim, podemos sugerir que os efeitos de PMNs ativados na contenção de *L. amazonensis* dependem substancialmente do contato direto estabelecido pelos neutrófilos e o receptor DC-SIGN de células dendríticas.

O TNF- α é uma citocina importante nas etapas de ativação de mecanismos microbicidas em células dendríticas e pode estar associado à resistência a infecção (ALLENBACH et al., 2008). Segundo Van Gisbergen (2005), o estabelecimento de sinapses imunológicas por intermédio das interações entre o Mac-1 de neutrófilos ativados e DC-SIGN de células dendríticas imaturas auxilia na transferência de TNF- α e, subsequentemente, na maturação das células dendríticas. No presente estudo, observamos que a produção de TNF- α é elevada quando as células dendríticas e neutrófilos estabelecem contato direto. As taxas de produção de tal citocinas no sobrenadante de tal cultura foi bastante reduzido mediante neutralização do DC-SIGN (Figura 9A). Assim, nossos dados sugerem que o DC-SIGN constitui uma plataforma para a interação física entre as células dendríticas e outros tipos celulares para que possa ser efetuada a transferência de mediadores

inflamatórios. Além disso, em nossos ensaios, analisamos as consequências da neutralização de tal citocina nas taxas de infecção e carga parasitária. Observamos que mediante a inibição do TNF- α ocorre um significativo aumento nas taxas de infecção e carga parasitária em células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* (Figura 9B).

Nossos achados estão em consonância com a maior parte dos estudos presentes na literatura, como os experimentos de Allenbach e colaboradores (2008) que associaram os efeitos do TNF- α à destruição de *L. major* em leucócitos mielóides, como macrófagos e células dendríticas. Diversos estudos também ressaltam a importância do TNF- α no controle da infecção in vivo de *L. amazonensis*. Os achados de Hu e colaboradores (2018) sugerem que a ausência de TNF- α contribui para a ativação alternativa de macrófagos e subsequente proliferação de *L. major* (HU et al., 2018). Ademais, outro estudo conduzido por Lopes e colaboradores (2018) com células dendríticas isoladas de pacientes com esquistossomose mostrou que há um aumento na susceptibilidade destas células à infecção por *L. braziliensis* devido à redução dos níveis séricos de TNF- α (LOPES et al., 2018). De maneira geral, dados presentes na literatura, assim como os do presente estudo, apontam um aumento na susceptibilidade de células dendríticas à infecção por *Leishmania* spp na ausência de TNF- α , que provavelmente culmina com uma menor ativação celular.

Os eicosanóides figuram como uma classe de moléculas bioativas com grande relevância em diversos processos inflamatórios e resolutivos (DEBEUF; LAMBRECHT, 2018). Quando metabolizado por diversas vias enzimáticas, o ácido araquidônico pode dar origem a vários ácidos graxos poliinsaturados, dentre eles os leucotrienos, as prostaglandinas e lipoxinas. A produção dos eicosanóides ocorre de maneira dependente do tipo celular envolvido, localização tecidual, e também em uma escala temporal em relação à progressão dos eventos inflamatórios. No nosso estudo, aventamos a possibilidade de que o DC-SIGN intermediaria a transferência de eicosanóides no contexto de interação entre PMNs ativados e células dendríticas infectadas por *L. amazonensis*. Assim, avaliamos a produção de eicosanóides biossintetizados por vias enzimáticas distintas a fim de avaliar quais delas eram preponderantes mediante a interação entre PMNs e DCs via DC-SIGN. Foi levado em consideração também o fato de que os PMNs são células reconhecidas pelo seu caráter lábil e que a produção de eicosanóides poderia estar associada à viabilidade dos neutrófilos. Assim, avaliamos a produção de PGE₂ e LTB₄ em dois tempos distintos de interação entre as células

estudadas (4 e 12 horas de interação). A análise de nossos dados sugere que a produção de PGE₂ e LTB₄ ocorrem de maneira dependente do contato via DC-SIGN e que a preponderância do tipo de eicosanoide depende do tempo de interação (FIGURAS 10 A e B). Estes achados estão de acordo com a ocorrência de um fenômeno muito apreciado na literatura: a mudança de classe de eicosanoides durante a progressão das respostas imunes. Em seu pioneiro estudo, Bruce e colaboradores (2001) realizaram uma análise temporal do predomínio das classes de eicosanoides em exsudatos clínicos e observaram uma mudança da síntese de LTB₄ para maior produção de PGE₂, associado com um desvio de um perfil “pro-inflamação” para um perfil resolutivo do processo inflamatório (LEVY et al., 2001). Além disso, nossos achados contribuem para a compreensão do papel do DC-SIGN na indução de biossíntese de eicosanoides, até então pouco descrita na literatura.

Diversos estudos relatam o envolvimento do LTB₄ no estabelecimento de respostas protetoras contra patógenos intracelulares. Morato e colaboradores (2014) demonstraram que, no contexto de infecção por *L. braziliensis*, a sinalização autócrina e parácrina do LTB₄ via ligação de alta afinidade com seu receptor BLT1 culminava no aumento da atividade leishmanicida de macrófagos humanos (MORATO et al., 2014a). Ademais, foi comprovado por Tavares e colaboradores (2014) que o eixo sinalizatório LTB₄-BLT1 contribui para a eliminação de *L. amazonensis* em neutrófilos humanos. Sabe-se que os neutrófilos são os principais produtores de leucotrienos em contextos inflamatórios. Assim, no nosso estudo, verificamos a possibilidade do eixo LTB₄ – BLT1 ser um dos mecanismos responsáveis pelo controle da infecção de *L. amazonensis* em células dendríticas. Observamos um significativo aumento nas taxas de infecção e carga parasitária em células dendríticas mediante a inibição farmacológica do BLT1 (FIGURA 11 a). De maneira similar, a inibição da síntese de LTB₄ em neutrófilos pré-tratados com zileuton também culminou em uma pronunciada elevação da infecção por *L. amazonensis*. Desta maneira, nossos dados apontam a participação deste leucotrieno no controle da infecção por *L. amazonensis*. Em 2016, Tavares e colaboradores avaliaram a contribuição dos grânulos de neutrófilos na restrição do crescimento de *L. amazonensis* em macrófagos humanos, demonstrando que o processo de degranulação era fundamental para a produção de fatores como TNF- α e LTB₄, que por sua vez, eram responsáveis pela eliminação parasitária (TAVARES et al., 2016). Além disso, evidências presentes na

literatura sugerem que a sinalização via LTB₄ induz a formação de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela destruição de patógenos (DENNIS; NORRIS, 2015). Futuros esforços serão concentrados na verificação deste mecanismo como principal forma de eliminação de *L. amazonensis* nas células dendríticas em contato com neutrófilos ativados.

Uma das principais consequências do estabelecimento do dialogo celular entre PMNs e DCs é a maturação destas últimas. Entretanto, ainda é muito controverso o entendimento de como o estado de ativação dos neutrófilos pode influenciar na capacidade de DCs em adquirir um fenótipo de apresentação de antígenos. Experimentos conduzidos por Van Gisbergen e colaboradores (2006) apontam uma possível relação entre maior expressão de MAC-1 de neutrófilos e altas taxas de maturação de células dendríticas mediante o co-cultivo destes dois tipos celulares. Já os estudos realizados por Megiovanni e colaboradores (2006) sugerem que a ativação de PMNs não surta efeitos na capacidade das DCs em maturar-se. Desta maneira, decidimos verificar os efeitos da comunicação entre neutrófilos ativados e células dendríticas no contexto de infecção por *L. amazonensis*. Observamos que DCs infectadas reduzem drasticamente a expressão de moléculas associadas a apresentação de antígeno como CD40, CD86 e MCH II (FIGURA 12 A e B). Ademais, foi verificado que a adição de neutrófilos ativados às células dendríticas infectadas foi capaz de restaurar os níveis de expressão de tais moléculas de maneira dependente do tempo de interação e disponibilidade do DC-SIGN para o estabelecimento de contato entre as células. Sabe-se que a ligação do DC-SIGN com seus receptores cognatos além de promover mais avidéz na comunicação com outros tipos celulares, também promove a ativação de vias sinalizatórias relacionadas com o aumento da expressão de moléculas associadas a apresentação de antígenos. Paradoxalmente, Caparrós e colaboradores (2006) verificaram que a interação do DC-SIGN com seus ligantes elicita o eixo ERK/PI3K que culminava em diferenças na expressão de citocinas, porém sem exercer influência na maturação das DCs (CAPARRÓS et al., 2006). Assim, ao analisar nossos dados, sugerimos que o DC-SIGN figura como uma plataforma que medeia a interação física das DCs com neutrófilos ativados, que por sua vez contribuem para maturação de células dendríticas através da liberação de TNF- α . Adicionalmente, verificamos que a presença de neutrófilos ativados em livre contato com as DCs promoveu aumento na intensidade média de fluorescência de tais moléculas como evidenciado por nossos experimentos em citometria de fluxo. Contudo, vale salientar que

este fenômeno pode ser observado apenas dentro das primeiras 4 horas de interação PMN-DCs, não sendo verificado após 12 horas de interação.

13 CONCLUSÃO

Neutrófilos humanos contribuem substancialmente no controle da infecção de *L. amazonensis* em células dendríticas. Tal restrição do crescimento do parasita deve-se ao contato físico direto estabelecido entre os dois tipos celulares por intermédio do receptor molecular DC-SIGN. No presente estudo, a interação celular via DC-SIGN mostrou-se necessária para a produção de TNF- α e LTB₄, responsáveis pela eliminação do parasita. Além disso, a comunicação entre neutrófilos e células dendríticas via DC-SIGN também aumentou as taxas de maturação das células dendríticas.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. *et al.* Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 2, p. 389–396, 2008.
- ALLENBACH, C. *et al.* An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 3, p. 720–731, 2008.
- ALTER, G.; ALTFELD, M. Mutiny or scrutiny: NK cell modulation of DC function in HIV-1 infection. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 5, p. 219–224, 2011.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- AMULIC, B. *et al.* Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 459–489, 2012.
- BARRAL, A. *et al.* Polar and Subpolar Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: Clinical and Immunopathologic Aspects. **International Journal of Dermatology**, v. 34, n. 7, p. 474–479, 1995.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.
- BENNETT, M.; GILROY, D. W. Lipid Mediators in Inflammation. **Microbiology spectrum** p. 1–21, 2016.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657–670, 2010.
- BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 8, p. 340–345, 2007.
- BREEDVELD, A. *et al.* Granulocytes as modulators of dendritic cell function. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 102, n. 4, p. 1003–1016, 2017.
- BROWN, G. D.; WILLMENT, J. A.; WHITEHEAD, L. C-type lectins in immunity and homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 6, p. 374–389, 2018.
- CAPARRÓS, E. *et al.* DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. **Blood**, v. 107, n. 10, p. 3950–3958, 2006.
- CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.
- CHARMOY, M. *et al.* Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, 2010.
- CHAVES, M. M.; CANETTI, C.; COUTINHO-SILVA, R. Crosstalk between purinergic receptors and lipid mediators in leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 9,

n. 1, p. 1–9, 2016.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in Leishmania. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 1–13, 2010.

CIEUTAT, A. M. *et al.* Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker. **Blood**, v. 91, n. 3, p. 1044–58, 1998.

COLLIN, M. Human dendritic cell subsets : an update. **Immunology** p. 3–20, 2018.

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

DAVID, C. V; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis th_1272 491..502. v. 22, p. 491–502, 2009.

DEBEUF, N.; LAMBRECHT, B. N. Eicosanoid control over antigen presenting cells in asthma. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. SEP, p. 1–12, 2018.

DELCLAUX, C. *et al.* Role of Gelatinase B and Elastase in Human Polymorphonuclear Neutrophil Migration across Basement Membrane. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 14, n. 3, p. 288–295, 1996.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 511–523, 2015.

EHRlich, A. *et al.* The Immunotherapeutic Role of Regulatory T Cells in Leishmania (Viannia) panamensis Infection. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 6, p. 2961–2970, 2014.

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

FAVALI, C. *et al.* Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. v. 82, n. December, p. 1401–1406, 2007.

FEIJÓ, D. *et al.* Dendritic cells and leishmania infection: Adding layers of complexity to a complex disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

FLORES, E. J. *et al.* Peptoanaerobacter stomatis primes human neutrophils and induces granule exocytosis. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 7, 2017.

GARCIA-VALLEJO, J. J.; VAN KOOYK, Y. The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 10, p. 482–486, 2013.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, S. Interaction of Leishmania parasites with dendritic cells and its functional consequences. **Immunobiology**.v. 209, p. 173–177, 2004.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. DA C. *et al.* The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, 2017.

- GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. DE L. R. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.
- GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.
- GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 82, p. 155–184, 2013.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of Leishmania with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.
- HANIFFA, M.; BIGLEY, V.; COLLIN, M. Human mononuclear phagocyte system reunited. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, p. 1–11, 2015.
- HOFFMANN, J. Activation of dendritic cells : translating innate into adaptive immunity. **Current opinion in immunology**.Caetano Reis e Sousa. p. 21–25, 2004.
- HU, S. *et al.* Absence of tumor necrosis factor supports alternative activation of macrophages in the liver after infection with Leishmania major. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JAN, 2018.
- JOHN, B.; HUNTER, C. A. Immunology: Neutrophil soldiers or Trojan horses? **Science**, v. 321, n. 5891, p. 917–918, 2008.
- JONES, H. R. *et al.* The role of neutrophils in inflammation resolution. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 2, p. 137–145, 2016.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006.
- KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 12, p. 984–993, 2003.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.
- KOTHARI, N. *et al.* Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an indicator of inflammation and onset of sepsis. **Journal of Critical Care**, v. 26, n. 4, p. 435.e1-435.e7, 2011.
- LAUFS, H. *et al.* Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 826–835, 2002.
- LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1299–1306, 2003.
- LEHRER, R. I.; LU, W. α -Defensins in human innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 245, n. 1, p. 84–112, 2012.
- LELIEFELD, P. H. C.; KOENDERMAN, L.; PILLAY, J. How neutrophils shape adaptive immune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. SEP, p. 1–8, 2015.

- LEVY, B. D. *et al.* Lipid mediator class switching during acute inflammation: Signals in resolution. **Nature Immunology**, v. 2, n. 7, p. 612–619, 2001.
- LEY, K. *et al.* Getting to the site of inflammation : the leukocyte adhesion cascade updated. v. 7, n. september, 2007.
- LEY, K. *et al.* Neutrophils: New insights and open questions. **Science Immunology**, v. 3, n. 30, p. eaat4579, 2018.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. June, p. 1–8, 2012.
- LOPES, D. M. *et al.* Susceptibility of dendritic cells from individuals with schistosomiasis to infection by Leishmania braziliensis. **Molecular Immunology**, v. 93, n. November 2017, p. 173–183, 2018.
- LUDWIG, I. S.; GEIJTENBEEK, T. B.; VAN KOOYK, Y. Two way communication between neutrophils and dendritic cells. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 4, p. 408–413, 2006.
- MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.
- MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. 1, p. 181–218, 2013.
- MOLL, H. Microreview Dendritic cells and host resistance to infection. **Cellular microbiology**.v. 5, p. 493–500, 2003.
- MORATO, C. I. *et al.* Essential role of leukotriene B₄ on Leishmania (Viannia) braziliensis killing by human macrophages. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 11, p. 945–953, 2014a.
- MORATO, C. I. *et al.* Essential role of leukotriene B₄ on Leishmania (Viannia) braziliensis killing by human macrophages. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 11, p. 945–953, 2014b.
- MULLER, W. A. Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. **Annual reviews pathology**.NIH Public Access. p. 323–344, 2013.
- NAUSEEF, W. M. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 1146–1155, 2014.
- NETEA, M. G. *et al.* Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A guiding map for inflammation. **Nature immunology**.v. 18, n. 8, p. 826–831, 2018.
- NICOLÁS-ÁVILA, J. Á.; ADROVER, J. M.; HIDALGO, A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. **Immunity**, v. 46, n. 1, p. 15–28, 2017.
- NOVAIS, F. O. *et al.* Neutrophils and Macrophages Cooperate in Host Resistance against Leishmania braziliensis Infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 8088–8098, 2009.

- NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 135, 2010.
- OGHUMU, S. *et al.* Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 389–396, 2010.
- PHAM, C. T. N. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 6–7, p. 1317–1333, 2008.
- PIGOTT, D. M. *et al.* Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**, v. 3, p. 1–21, 2014.
- PRETE, A. DEL *et al.* Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by expression and function Regulation of dendritic cell migration and adaptive immune response by leukotriene B 4 receptors : a role for LTB 4 in up-regulation of CCR7 expression and function. **Blood**. v. 109, n. 2, p. 626–631, 2011.
- REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis. **Lancet infectious disease**. 2007.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. May, p. 1–8, 2012.
- ROHOUSOVÁ, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: Effects on host immune response and Leishmania transmission. **Folia Parasitologica**, v. 53, n. 3, p. 161–171, 2006.
- RØRVIG, S. *et al.* Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 711–721, 2013.
- SCHRIEFER, A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 483–488, 2008.
- SEGAL, A. W. UKPMC. How Neutrophils Kill Microbes. **Biological Membranes**, v. 2, n. 3, 2007.
- SEMNANI, R. T. *et al.* Filarial Antigens Impair the Function of Human Dendritic Cells during Differentiation. **Infection and Immunity**. v. 69, n. 9, p. 5813–5822, 2001.
- SILVEIRA, F. T. *et al.* Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 11, p. 1075–1080, 2008.
- SOONG, L. NIH Public Access. Modulation of dendritic cells by Leishmania parasites. **Journal of immunology**.v. 377, n. 2, p. 364–377, 2009.
- SPRANGERS, S.; VRIES, T. J. DE; EVERTS, V. Monocyte Heterogeneity : Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. **Journal of immunology research**. v. 2016, 2016.
- STEINMAN, R. M. Dendritic cells : Understanding immunogenicity. **European journal of immunology**. p. 53–60, 2007.

- SUMMERS, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 8, p. 318–324, 2010.
- TAVARES, N. *et al.* Degranulating Neutrophils Promote Leukotriene B4 Production by Infected Macrophages To Kill *Leishmania amazonensis* Parasites. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 4, p. 1865–1873, 2016.
- TAVARES, N. M. *et al.* Understanding the Mechanisms Controlling *Leishmania amazonensis* Infection In Vitro: The Role of LTB4 Derived From Human Neutrophils. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, p. 1–11, 2014.
- TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 750, 2017.
- VALLEJO, A. F. *et al.* Malaria systems immunology: *Plasmodium vivax* induces tolerance during primary infection through dysregulation of neutrophils and dendritic cells. **Journal of Infection**, v. 77, n. 5, p. 440–447, 2018.
- VAN GISBERGEN, K. P. J. M. *et al.* Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 8, p. 1281–1292, 2005.
- VAN GISBERGEN, K. P. J. M.; GEIJTENBEEK, T. B. H.; VAN KOOYK, Y. Close encounters of neutrophils and DCs. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 12, p. 626–631, 2005.
- VERCELLOTTI *et al.* Brief Report. **Immunology**. v. 2, n. 2, p. 1063–1069, 2015.
- WAGER, C. M. L.; WORMLEY, F. L. Classical versus alternative macrophage activation: The Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections. **Mucosal Immunology**, v. 7, n. 5, p. 1023–1035, 2014.
- WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil Migration Mechanisms , with an Emphasis on the Pulmonary Vasculature. **Pharmacological research**. v. 52, n. 3, p. 349–374, 2000.
- WILLIAM VANDIVIER, R. *et al.* Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 5, p. 661–670, 2002.
- WOODFIN, A.; VOISIN, M.; NOURSHARGH, S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. **Current opinion in hematology**.v. 17, n. 1, p. 9–17, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANISATION. **Status of endemicity of CL worldwide 2016**, 2016. Disponível em:
https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf
- XHO, S. I. *et al.* *Plasmodium falciparum* - infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. **Nature**.v. 400, n. July, p. 73–77, 1999.

