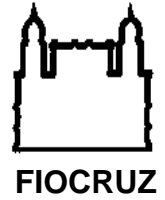




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

**Avaliação da interação entre neutrófilos e *Leishmania
braziliensis***

Sarah de Athayde Couto Falcão

Salvador-Bahia-Brasil

2013

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**Avaliação da interação entre neutrófilos e *Leishmania
braziliensis***

**Sarah de Athayde Couto Falcão
Orientadora: Dra. Camila Indiani de Oliveira**

**Tese apresentada para a
obtenção do grau de Doutor
em Patologia Experimental**

Salvador-Bahia-Brasil

2013

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E *LEISHMANIA
BRAZILENSIS*

SARAH DE ATHAYDE COUTO FALCÃO

**FOLHA DE APROVAÇÃO
COMISSÃO EXAMINADORA**

Dr. _____

Dr. _____

Dr. _____

Dr. _____

Dra. Camila Indiani de Oliveira

Tecnologista

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Jorge Falcão Paredes, exemplo de dedicação à pesquisa e à ciência. À minha mãe, Norma Couto, que sempre apoiou e acreditou em mim. À minha avó Dalva Couto, grande incentivadora e, à memória do meu avô José de Lima Couto, um exemplo como educador para minha família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Norma e Jorge, por todo o apoio, amor e torcida;

À Pablo, pela paciência, imenso apoio e carinho;

À Dra. Camila Indiani de Oliveira pela atenção e orientação para o desenvolvimento desse trabalho;

À Dra. Fabienne Tachinni-Cottier pela colaboração e pela acolhida na Universidade de Lausanne (Suíça) para o doutorado sanduiche;

À Dra. Valéria Borges pela colaboração e por toda a contribuição intelectual;

À Dra. Cláudia Brodskyn pelas sugestões enriquecedoras;

À Dra. Aldina Barral e Dr. Manoel Barral-Netto pela acolhida no laboratório;

À Dra. Tiffany Weinkopff e a Benjamin Hurrell pela ajuda nos experimentos na Universidade de Lausanne;

À Dra. Deboraci Prates pela contribuição para este trabalho;

À Fabiana Celes e Rebecca Curvelo que contribuíram imensamente para este trabalho;

Aos colegas do “Grupo Camila” pelas contribuições em nossas reuniões;

A todos os colegas do LIP e LIMI, uma grande equipe sempre disposta a ajudar;

À plataforma de microscopia do Cpqgm;

Às secretárias do LIMI-LIP, Elze Leite e Andrezza Souza;

Aos funcionários do CPqGM;

Aos professores e secretárias da pós-graduação em Patologia;

À agência financiadora: CAPES.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO GERAL.....	24
3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
5 RESULTADOS.....	34
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE ABREVIATURAS

BPI – *Bactericidal permeability-increasing protein*
BSA – Soro bovino albumina
C3 – Molécula do complemento 3
CR3 – Receptor do complemento 3
DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole
DCs – Células dendríticas
DNA – Ácido desoxirribonucleico
FACS – *Fluorescence activated cell sorting*
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
H&E – Hematoxilina & Eosina
ICAM1 – *Intercellular adhesion molecule 1*
ICAM 2 – *Intercellular adhesion molecule 2*
IFN-g – Interferon- gama
IL-10 – Interleucina-10
IL-12 – Interleucina-12
IL-12p40 – Interleucina-12 p40
IL-4 – Interleucina 4
ERK1/2 – Quinase reguladora de sinais extracelulares 1/2
Lb – *Leishmania braziliensis*
LC – Leishmaniose cutânea
LCD – Leishmaniose cutâneo-difusa
LCL – Leishmaniose cutâneo-localizada
LCM – Leishmaniose cutâneo-mucosa
LPG – Lipofosfoglicano
LPS – Lipopolissacarídeo
LT – Leishmaniose tegumentar
LTA – Leishmaniose tegumentar americana
LV – Leishmaniose visceral
NE – Elastase neutrofílica
NETs – Redes extracelulares de neutrófilos
NO – Óxido nítrico

NRAMP1 – *Natural resistance-associated macrophage protein 1*
PAF – Fator de ativação de plaquetas
PBS – Tampão-fosfato salina (fosfato de sódio de potássio 10%/ cloreto de sódio 45%)
PCR – Reação de polimerase em cadeia
PE – Ficoeritrina
PGE-2 – Prostaglandina 2
PGRPs – Proteínas de reconhecimento de peptídeoglicanos
PMA – Forbol 12-Miristato 13-Acetato
PMNs – Células polimorfonucleares
PS – Fosfatidilserina
RNA – Ácido ribonucleico
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR – *Reverse transcriptase PCR*
TGF-b – *Transforming growth factor-beta*
TGF-b1 – *Transforming growth factor-beta 1*
Th1 – *T helper cells 1*
Th2 – *T helper cells 2*
TLR – *Toll like receptor*
TNF-a – *Tumor necrosis fator-alpha*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania* sp.

Figura 2: Fagocitose e processo microbicida em neutrófilos.

Figura 3: Conteúdo dos grânulos neutrofílicos.

Figura 4: Fenotipagem das células dendríticas.

Figura 5: Pureza dos neutrófilos obtidos de animais estimulados com tioglicolato.

Figura 6: Cinética de infecção de neutrófilos do peritônio por *L. braziliensis*.

Figura 7: Neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis* expressam CD18 e CD62L.

Figura 8: Neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis* produzem superóxido.

Figura 9: Neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis* secretam elastase neutrofílica.

Figura 10: Baixos níveis de TNF-a por neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis*.

Figura 11: Neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis* secretam CCL3 e CCL4.

Figura 12: Neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis* induzem quimiotaxia de células dendríticas.

Figura 13: Pureza da separação magnética de neutrófilos Ly6G+ derivados da medula óssea.

Figura 14: Cinética de infecção de neutrófilos obtidos da medula óssea por *L. braziliensis*.

Figura 15: Neutrófilos da medula óssea infectados com *L. braziliensis mCherry* expressam CD18 e CD62L.

Figura 16: Neutrófilos da medula óssea expostos a *L. braziliensis* produzem superóxido.

Figura 17: Neutrófilos da medula óssea infectados com *L. braziliensis* produzem superóxido.

Figura 18: Neutrófilos da medula óssea expostos a *L. braziliensis* secretam elastase neutrofílica.

Figura 19: Neutrófilos da medula óssea expostos a *L. braziliensis* produzem níveis mais elevados de TNF- α .

Figura 20: Morfologia de neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis*.

Figura 21: Quantificação da taxa de apoptose de neutrófilos expostos a *L. braziliensis*.

Figura 22: *L. braziliensis* induz apoptose em neutrófilos da medula óssea infectados.

Figura 23: A depleção de neutrófilos aumenta o número de parasitas em camundongos infectados com *L. braziliensis*.

Figura 24: Modelo final proposto.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS E *L. braziliensis*. SARAH DE ATHAYDE COUTO FALCÃO. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem como principal agente etiológico a *L. braziliensis* e é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, por seu alto coeficiente de detecção e sua capacidade de produzir deformidades. O neutrófilo é considerado a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos ou substâncias estranhas e o seu rápido recrutamento para os tecidos é fundamental para o sistema imune inato. No modelo murino de infecção por *L. braziliensis*, mostramos um constante recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. Baseados nesses resultados, nós formulamos uma hipótese que os neutrófilos desempenham um papel importante durante os estágios iniciais de infecção com *L. braziliensis*. Assim, conduzimos experimentos com neutrófilos recrutados com tioglicolato e neutrófilos derivados de medula óssea. Inicialmente, observamos que os neutrófilos são prontamente infectados com parasitas opsonizados com soro fresco. O contato entre neutrófilos e *L. braziliensis* ativou os neutrófilos, aumentando a expressão de CD18 e diminuindo a expressão de CD62L. Essa ativação levou à produção de superóxido, secreção de elastase e liberação de TNF- α . O contato com *L. braziliensis* não impediu a apoptose dos neutrófilos e a destruição dos parasitas internalizados. Utilizando anticorpos específicos para neutrófilos, observamos o aumento significativo no número de parasitas em animais depletados de neutrófilos. Em paralelo, o contato dos neutrófilos com *L. braziliensis* levou à secreção de quimiocinas, capazes de induzir o recrutamento de células dendríticas. Os neutrófilos, portanto, desempenham um papel importante no combate ao parasita no período inicial da infecção por *L. braziliensis*. [PALAVRAS CHAVE] Leishmaniose, *Leishmania braziliensis*, neutrófilos, BALB/c.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE INTERACTION BETWEEN NEUTROPHILS AND *L. braziliensis*. **SARAH DE ATHAYDE COUTO FALCÃO**. *L. braziliensis* is the main etiological agent of American Cutaneous Leishmaniasis, a disease that deserves further attention due to the high detection rate and ability to produce deformities. The neutrophil is considered the first line of defense against infectious agents or foreign substances and their rapid recruitment into tissues is critical for the innate immune system. In a murine model of infection with *L. braziliensis*, we showed a constant recruitment of neutrophils to the site of infection. Based on this finding, we hypothesized that neutrophil may play an important role during the initial stages of *L. braziliensis* infection. Experiments were conducted using thymoglycolate-recruited and bone marrow-derived neutrophils. We initially observed that neutrophils are readily infected by fresh serum-opsonized parasites. Neutrophil upon *L. braziliensis* interaction, neutrophil became activated, increasing the expression of CD18 and decreasing the expression of CD62L. This activation led to the production of superoxide, neutrophil elastase secretion and release of TNF- α . Neutrophil infection with *L. braziliensis* did not prevent neutrophil apoptosis or destruction of internalized parasites. Using a neutrophil-depleting antibody, we detected a significant increase in parasite numbers in neutrophil-depleted mice. In parallel, the contact of neutrophils with *L. braziliensis* led to secretion of chemokines, able to induce the recruitment of dendritic cells. Therefore, we can conclude that neutrophils play an important role in combating parasite during initial infection by *L. braziliensis*. [KEYWORDS] Leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, neutrophils, BALB/c.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é causada por espécies de protozoários unicelulares, do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae*. O gênero *Leishmania* pode ser dividido em dois subgêneros: o subgênero *Leishmania*, que engloba o complexo *Leishmania donovani* e o complexo *L. mexicana*, e o subgênero *Viannia*, que engloba apenas o complexo *L. braziliensis* (Grimaldi & Tesh, 1993). Esses protozoários são parasitos digenéticos (heteroxenos), encontrados nas formas flageladas promastigotas, no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, e amastigotas, presentes em células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados.

A Organização Mundial de Saúde estima que a leishmaniose está presente em 98 países, com registro de 20.000 a 40.000 mortes por leishmaniose por ano (Alvar *et al.*, 2012). A leishmaniose apresenta duas formas clínicas principais: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT). A LV é uma forma grave e pode ser fatal se não for tratada, devido à infecção generalizada que acomete o sistema reticuloendotelial envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodo (Bitterncourt & Barral-Netto, 1995). A LT é caracterizada por um espectro de manifestações clínicas: leishmaniose cutâneo-localizada (LCL), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) (revisado em Reithinger *et al.*, 2007). Nas Américas, a LT é causada por uma variedade de espécies, sendo seus principais agentes etiológicos a *L. braziliensis*, a *L. amazonensis* e a *L. guyanensis*, enquanto que, no Velho Mundo, as espécies responsáveis pela LT são, entre outras, a *L. major* e a *L. tropica*.

A transmissão da *Leishmania* sp. ocorre quando os hospedeiros vertebrados são picados pelas fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sangüíneo, as quais inoculam as formas promastigotas metacíclicas (Figura 1). Apesar do macrófago ser considerado a principal célula hospedeira, recentemente passou-se a considerar a participação de neutrófilos nos momentos iniciais da infecção (revisado em Nathan, 2006). Os neutrófilos são recrutados para o sítio de infecção e fagocitam

as formas promastigotas. Eventualmente, os neutrófilos liberam as promastigotas e estas quando fagocitadas por macrófagos transformam-se em amastigotas intracelularmente em compartimentos da via endocítica, os vacúolos parasitófaros. No interior do macrófago, os vacúolos parasitófaros fusionam-se com lisossomo onde o parasito se multiplica por divisão binária em meio ácido rico em enzimas hidrolíticas. Após sucessivas multiplicações, o macrófago rompe-se e as amastigotas liberadas serão fagocitadas por outras células hospedeiras, propagando a infecção no hospedeiro vertebrado.

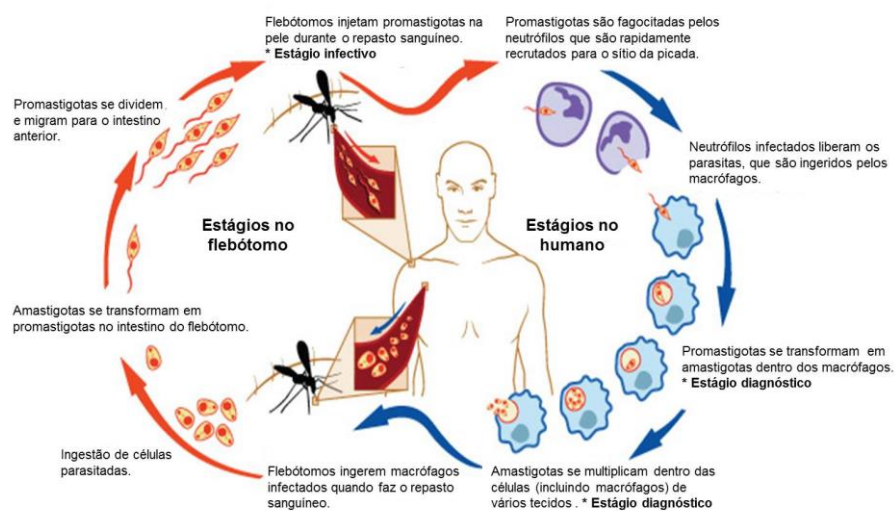


Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania* sp. (National institute of allergy and infectious diseases, 2012).

O hospedeiro invertebrado é infectado quando ocorre a ingestão das formas amastigotas, presentes no sangue e/ou na linfa intersticial do indivíduo ou do animal infectado, no momento do repasto sanguíneo do inseto vetor. A fêmea do inseto, ao alimentar-se novamente, inocula no hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas, permitindo assim fechando o ciclo.

1.2 Neutrófilos

O neutrófilo ou leucócito polimorfonuclear é liberado da medula óssea, cai na circulação vascular e circula por tecidos periféricos. O neutrófilo é considerado a primeira linha de defesa, pois é capaz de migrar rapidamente. O recrutamento de

neutrófilos dos vasos para o meio extravascular é dependente do contato da célula com receptores no endotélio e dependente de mediadores solúveis. Os neutrófilos lentamente rolam ao longo da superfície endotelial através de interações com glicoproteínas, conhecidas como selectinas. A CD62L é uma L-selectina expressa constitutivamente na superfície dos neutrófilos, a qual permite uma adesão de baixa afinidade entre o neutrófilo e o endotélio permitindo o rolamento do neutrófilo ao longo do vaso. Após a ativação de neutrófilos, a sua expressão é reduzida. Na presença de mediadores inflamatórios, como quimiocinas, as interações entre o neutrófilo e o endotélio aumentam em afinidade e são intermediadas pelas Beta-integrinas (Mac-1) e moléculas de adesão intracelular como molécula de adesão intracelular como célula endotelial tipo 1 (ICAM-1) e molécula de adesão intracelular como célula endotelial tipo 2 (ICAM-2). Em seguida, as quimiocinas estimulam os neutrófilos aderidos ao endotélio a transmigrar, atravessando o espaço entre as células endoteliais, permitindo assim, a chegada dos neutrófilos ao sítio de infecção (Kobayashi & Deleo, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2008).

No sítio da infecção, muitas moléculas produzidas por micro-organismos, que são agonistas de receptores do tipo *toll* (TLR), podem induzir o aumento da vigilância e a remoção dos patógenos no sítio da infecção. Em geral, a ligação a esses receptores de reconhecimento ativa a transdução de sinais capazes de prolongar a sobrevivência do neutrófilo, facilitando adesão e fagocitose. A fagocitose de micro-organismos pelos neutrófilos é promovida de forma eficiente após a opsonização de patógenos pelas proteínas do hospedeiro, tais como a molécula C3b e C3bi do complemento. Os patógenos opsonizados por C3 são reconhecidos pelos receptores CR1, CR3 (molécula heterodímera também chamada de Mac-1 e formada pelas moléculas de superfície CD11b e CD18) e CR4, presentes na superfície do neutrófilo, e são então fagocitados. Os patógenos também podem ser opsonizados por anticorpos, os quais são reconhecidos pelos receptores Fc, presentes na superfície do neutrófilo. A ligação do patógeno via receptor CR3 (Mac-1) ou via receptor Fc dispara mudanças no citoesqueleto do neutrófilo que permitem o processo físico da fagocitose (revisado em Kobayashi & Deleo, 2009) (Figura 2).

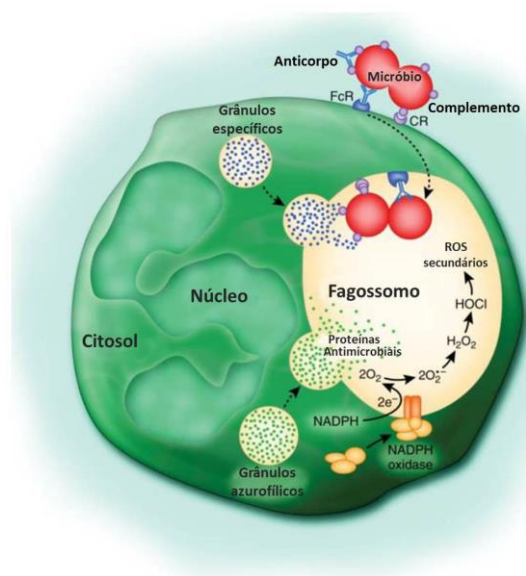


Figura 2: Fagocitose e processo microbicida em neutrófilos. Ligação e fagocitose de micróbio opsonizado com anticorpo ou com complemento. A fagocitose desencadeia a produção de superóxido (O_2^-), a partir do qual outros derivados são formados, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ácido hipocloroso (HOCl) (revisado em Kobayashi & Deleo, 2009).

A fagocitose inicia a execução de diversos mecanismos microbicidas do neutrófilo entre eles 1) produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e seus derivados e 2) degranulação, quando há a liberação de peptídeos, proteínas e enzimas antimicrobianas (revisado em Kobayashi & Deleo, 2009). Esses mecanismos de morte são classificados em mecanismos oxidativos e não oxidativos. O mecanismo oxidativo consiste no sistema NADPH oxidase que gera as ROS, as quais são liberadas no fagolisossomo. Como mostrado na Figura 2, o patógeno é fagocitado e internalizado no fagolisossomo. A NADPH oxidase reduz O_2 em superóxido (O_2^-) que induz o influxo de íons H^+ e K^+ . Esse gradiente de íons leva à fusão dos grânulos azurofílicos e de grânulos específicos ao fagolisossomo, onde proteases séricas solúveis são liberadas. O superóxido e os íons $2H^+$ formam peróxido de hidrogênio que é convertido em ácido hipocloroso (HOCl), letal para o patógeno (revisado em Nathan, 2006; revisado em Segal, 2007).

A secreção de grânulos, tais como azurofílicos e grânulos específicos, constitui o mecanismo microbicida não oxidativo. Nesse mecanismo, os grânulos neutrofilicos, peptídeos e proteases anti-microbianas são liberados no fagolisossomo (Figura 2) ou são exocitados. Existem quatro tipos de grânulos neutrofilicos: os azurofílicos, os específicos, as gelatinases e os grânulos secretores, em ordem decrescente de tamanho (Figura 3). Quanto menores forem, maior a tendência a serem exocitados, tais como os grânulos secretores, por exemplo (revisado em Kobayashi & Deleo, 2009; revisado em Pham, 2006).

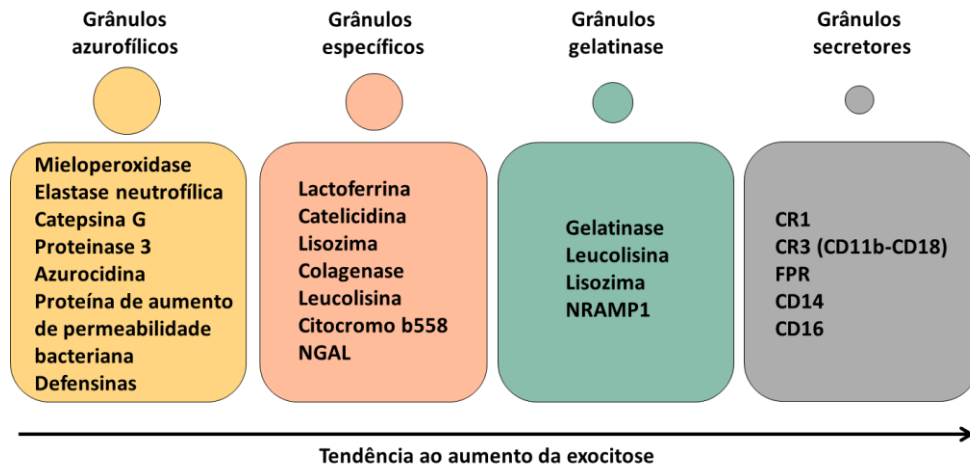


Figura 3: Conteúdo dos grânulos neutrofílicos (revisado em Pham, 2006).

Entre os componentes dos grânulos azurofílicos está a elastase neutrofílica (NE) que pode diretamente degradar a proteína A da membrana da *E. coli* e clivar fatores de virulência presentes em *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* e *Yersinia enterocolitica* (revisado em Pham, 2006). Um exemplo de componente de grânulo específico é o citocromo b₅₅₈. Quando o neutrófilo é ativado, o citocromo b₅₅₈ é transferido para a superfície da membrana do fagossomo e funciona como um carreador terminal de elétrons durante a explosão oxidativa. A proteína 1 associada a resistência natural de macrófago (NRAMP1), primeiramente identificada em macrófagos, está presente nos grânulos gelatinase dos neutrófilos. Após a degranulação, a proteína também é translocada para a membrana do fagossomo e opera como um transportador de cátions divalentes essenciais, privando os microrganismos aí presentes de metais como Fe²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺. As membranas das vesículas secretoras são ricas em CR3, CR1, CD14 e CD16, entre outros, os quais são incorporados na membrana plasmática após a exocitose. A mobilização de vesículas secretoras é acompanhada pelo aumento da expressão de L-selectina (CD62L) na superfície da membrana do neutrófilo. Essas mudanças na superfície do neutrófilo estabelecem um contato firme com o endotélio vascular ativado, contribuindo para o recrutamento de neutrófilos (revisado em Faurschou & Borregaard, 2003).

Mais recentemente, outro mecanismo de morte extracelular foi descrito para os neutrófilos. Nesse mecanismo, os neutrófilos liberam redes extracelulares (NETs) contendo DNA, histonas e proteínas presentes nos grânulos (mieloperoxidase, elastase neutrofílica, catepsina G, BPI (proteínas que aumentam a permeabilidade

bacteriana), lactoferrina, gelatinase, proteínas de reconhecimento de peptídeoglicanos (PGRPs) e calprotectina que, juntos, são capazes de capturar e inativar patógenos (revisado em Abdallah & Denkers, 2012). A formação de NETs, processo conhecido como netose, é agora considerada um tipo de morte celular programada, independente da apoptose e da necrose. A netose já foi observada em resposta a bactérias, fungos, vírus e protozoários (vírus da imunodeficiência humana (HIV1), *T. gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Eimeria bovis*). Ademais, estudos indicam que a formação de NETs é dependente do complexo NADPH oxidase e que a mieloperoxidase e a elastase neutrofílica também regulam a formação das NETs (revisado em Brinkmann & Zychlinsky, 2012; Saitoh *et al.*, 2013). A presença de NETs foi observada após o contato de neutrófilos humanos com *L. amazonensis* (Guimarães-Costa *et al.*, 2009). Os autores observaram que tanto o parasita quanto o lipofosfoliglicano (LPG) purificado induziram a netose e o efeito microbicida das NETs foi revertido pela adição de DNase. Os autores também mostraram a presença de redes de elastase em biópsias de pacientes com LT. Em outro trabalho, observou-se que a formação de NETs na infecção por *L. donovani* e, nesse caso, os parasitas sobreviveram às NETs devido ao LPG presente na superfície da membrana do patógeno e este não foi o responsável pela indução de NETs (Gabriel *et al.*, 2010).

Os neutrófilos têm um período de vida curto e, após atingir esse tempo, essas células morrem por apoptose, estando infectadas ou não (Abbas *et al.*, 2008). A apoptose é um tipo de morte celular acompanhada de retração de pseudópodos, redução do volume celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, sem que haja modificações das organelas citoplasmáticas. Há o surgimento de *blebbing* na membrana plasmática (embora a mesma se mantenha íntegra até os estágios finais do processo) e, por último, a célula apoptótica é capturada por um fagócito residente. A fragmentação do DNA e a ativação de caspases ocorrem na apoptose mas não são específicas deste tipo de morte celular (revisado em Kroemer *et al.*, 2009). Os neutrófilos podem ser caracterizados como células apoptóticas iniciais quando a membrana plasmática mantém-se intacta, mas há exposição de fosfatidilserina (PS) na superfície extracelular, levando ao seu reconhecimento por fagócitos. Os neutrófilos em apoptose inicial podem entrar em apoptose tardia ou em necrose secundária, quando a membrana plasmática torna-se permeável (revisado em Poon *et al.*, 2010). A apoptose tardia ou necrose secundária difere da necrose,

pois nessa ocorre um ganho de volume na célula, ruptura da membrana celular e a consequente perda do conteúdo intracelular. A apoptose de neutrófilos exerce uma influência na resposta imune do hospedeiro, muitas vezes favorecendo o patógeno. Em modelo experimental de infecção, a *M. tuberculosis* inibiu a apoptose do neutrófilo, evitando a distribuição da bactéria no sítio de infecção. Isso dificultou a aquisição de bactérias pelas células dendríticas (DCs), atrasando a ativação das mesmas e, por sua vez, a ativação de células T (Blomgran *et al.*, 2012).

Após a apoptose, a remoção e a degradação de corpos apoptóticos são feitas por células assistentes *scavengers* ou de varredura, caracterizando um processo importante e altamente conservado evolutivamente chamado de eferocitose (revisado em Thorp & Tabas, 2009). A eferocitose de células em fase inicial de apoptose, quando as organelas e membranas ainda estão intactas, previne a necrose e evita a liberação de moléculas inflamatórias (revisado em Silva, 2010). Além disso, a eferocitose induz secreção de moléculas anti-inflamatórias tais como fator de crescimento transformante-beta (TGF- β), interleucina-10 (IL-10) e prostaglandina-2 (PGE-2). Defeitos ou atrasos na eliminação de corpos apoptóticos estão associados com necrose tecidual, inflamação patológica e doenças auto-imunes (revisado em Thorp & Tabas, 2009). Em trabalhos realizados com *L. major*, observou-se que macrófagos murinos, cultivados com neutrófilos apoptóticos, apresentaram baixa secreção de interleucina-12 (IL-12) e alta produção de IL-10. Além disso, a NE foi importante para indução de um fenótipo regulador no macrófago. Ainda, a eferocitose de neutrófilos pelos macrófagos aumentou a carga parasitária quando os camundongos foram inoculados com neutrófilos apoptóticos e foram posteriormente infectados (Filardy *et al.*, 2010).

1.3 Neutrófilos e *Leishmania*

O papel dos neutrófilos na infecção por *Leishmania* foi primeiramente estudado em modelos experimentais de LT causada por *L. major*. Em camundongos C57BL/6 resistentes à infecção, a depleção de neutrófilos aumentou a carga parasitária, enquanto que em camundongos BALB/c, suscetíveis, houve diminuição do número de parasitas (Lima *et al.*, 1998; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). A secreção de interleucina-4 (IL-4) foi observada em

camundongos BALB/c infectados com *L. major* e a depleção de neutrófilos, com anticorpo monoclonal NIMP-R14, diminuiu a produção de IL-4, indicando que os neutrófilos induzem um perfil de célula T auxiliadora 2 (Th2). Em animais C57BL/6, resistentes à infecção por *L. major*, não foi observada a produção de IL-4 (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Um trabalho posterior mostrou que a depleção de neutrófilos de camundongos BALB/c com o anticorpo RB6-8C5 exacerbou a lesão, a carga parasitária e a secreção de IL-4 (Chen *et al.*, 2005), o que poderia estar relacionado ao anticorpo utilizado para a depleção. A produção de citocinas por neutrófilos infectados com *L. major* difere significativamente entre células obtidas de animais resistentes (C57BL/6) ou suscetíveis (BALB/c): as citocinas IL-10 e IL-12 são produzidas por neutrófilos da cepa resistente (C57BL/6) enquanto que camundongos BALB/c produzem interleucina-12 p40 (IL-12p40) e TGF- β , citocinas que inibem a diferenciação de células CD4⁺ em célula T auxiliadora 1 (Th1) (Charmoy *et al.*, 2007). Desta maneira, os neutrófilos parecem exercer um efeito modulador e este efeito varia em camundongos resistentes (C57BL/6) ou suscetíveis (BALB/c) à infecção por *L. major*.

Por meio de ensaios de microscopia em tempo real, foi demonstrado que ocorre uma infiltração maciça de neutrófilos na derme de camundongos expostos à picada de flebotomos infectados com *L. major* (Peters *et al.*, 2009). Os autores observam que os parasitas associam-se inicialmente com neutrófilos, ao invés de monócitos/macrófagos ou células dendríticas. Van Zandbergen *et al.* (2004) observaram que promastigotas de *L. major* fagocitadas por neutrófilos continuam viáveis e que isto pode favorecer o estabelecimento da doença neste modelo experimental. Essa hipótese do “Cavalo de Tróia” foi estabelecida por ensaios *in vitro*, nos quais demonstraram que ao entrar em apoptose, os neutrófilos humanos infectados com *L. major* liberam CCL4 e induzem o recrutamento de monócitos. Assim, ocorre a fagocitose dos neutrófilos apoptóticos e a entrada dos parasitas na célula hospedeira de forma silenciosa.

Um trabalho publicado posteriormente demonstrou uma rápida chegada de plaquetas ao sítio de infecção por *L. major*, ao invés de neutrófilos. As plaquetas foram ativadas e, por sua vez, induziram fatores quimio-atraentes para monócitos que chegaram ao local antes mesmo dos neutrófilos, sendo então os monócitos as primeiras células a fagocitar e a controlar a infecção por *L. major* (Gonçalves *et al.*, 2011). Mais recentemente, contrapondo o trabalho de Gonçalves *et al.* (2011),

neutrófilos foram vistos no sítio da infecção em camundongos C57BL/6 após uma hora de infecção, tanto após injeção de parasitas ou após a ruptura da derme com a agulha utilizada para a injeção. Além disso, após quatro horas, a presença de *L. major* ocasionou um recrutamento maior de neutrófilos enquanto que o pico de recrutamento de monócitos ocorreu um dia após a infecção (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012).

Existem relatos que mostram um papel protetor dos neutrófilos nas infecções por duas outras espécies de *Leishmania*: *L. donovani* e *L. infantum*, ambas agentes etiológicos da LV. Assim, foi descrito que a depleção de neutrófilos com anticorpo NIMP-R14 aumentou significativamente a carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*. Em paralelo, houve um aumento nos níveis de IL-4 e IL-10 (McFarlane *et al.*, 2008). Da mesma maneira, o aumento da carga parasitária no baço foi visto em camundongos BALB/c, depletados de neutrófilos com anticorpo RB6-8C5 e infectados com *L. infantum* (Rousseau *et al.*, 2001). Mais recentemente, Thalhoffer *et al.* (2011) estudaram a cinética de migração de neutrófilos em camundongos infectados com *L. infantum chagasi*. Os autores observaram um pico de migração de neutrófilos seis horas após a inoculação dos parasitas na orelha. Os autores notaram a presença de neutrófilos infectados e essa situação se manteve até um dia após a infecção. Já o pico de migração de macrófagos foi observado após três dias de infecção. Nesse trabalho, a depleção de neutrófilos diminuiu a remoção de parasitas, sugerindo que os neutrófilos participam desse processo (Thalhoffer *et al.*, 2011).

Em relação à apoptose, inicialmente, foi observado que a internalização da *L. major* é capaz de inibir a apoptose do neutrófilo humano (Aga *et al.*, 2002), a apoptose de neutrófilos infectados com *L. major* foi observada apenas após 42 horas de infecção (Van Zandbergen *et al.*, 2004). Assim, a entrada dos patógenos nos macrófagos via eferocitose (fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados) pode servir como um “cavalo de Tróia” para esses patógenos (revisado em Laskay *et al.*, 2007). Posteriormente, a via pela qual a *L. major* induz o atraso da apoptose do neutrófilo humano foi decifrada: a ativação de quinase reguladora de sinais extracelulares 1/2 (ERK1/2) é necessária para que haja um aumento da expressão de Bfl-1 e Bcl-2, moléculas anti-apoptóticas, que inibem a liberação de citocromo c pelas mitocôndrias e, por fim, bloqueiam a ativação de caspase-3 e de caspase-6. Com isso, o parasita consegue atrasar a apoptose do neutrófilo, na infecção por *L.*

major (Sarkar *et al.*, 2012). Ribeiro-Gomes *et al.* (2004) relataram que a presença de neutrófilos vivos ou mortos diminuiu o número de parasitas em macrófagos de camundongos resistentes, enquanto o efeito oposto foi observado em macrófagos de animais suscetíveis. A depleção de neutrófilos diminuiu a carga parasitária nos camundongos suscetíveis e aumentou nos animais resistentes (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Esses dados sugerem que os neutrófilos exercem papel importante no controle da infecção em animais resistentes e, opostamente, contribuem para infecção no animal suscetível. Além disso, a fagocitose de neutrófilos humanos apoptóticos, aumentou a carga parasitária e a porcentagem de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, enquanto que o mesmo não foi observado após a fagocitose de neutrófilos necróticos (Afonso *et al.*, 2008). Foi observado também que fator de crescimento transformante-beta 1 (TGF- β 1) e PGE-2 estão envolvidos na exacerbação da replicação da *L. amazonensis* em macrófagos infectados e co-cultivados com neutrófilos humanos apoptóticos. No entanto, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) está envolvido no controle da replicação do parasita pelos neutrófilos necróticos, assim como a elastase neutrofílica (Afonso *et al.*, 2008). Macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* e co-cultivados com neutrófilos viáveis apresentaram amastigotas destruídas em seu interior. Essa atividade leishmanicida, observada após o co-cultivo entre macrófagos e neutrófilos foi associada com a presença de TNF- α , óxido nítrico (NO), ROS, NE e fator de ativação de plaquetas (PAF) (Carmo *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado que os neutrófilos também estão envolvidos na resposta imune adaptativa (Scapini *et al.*, 2001). Neutrófilos infectados com *T. gondii* induziram a quimiotaxia de células dendríticas, via CCL3, CCL4, CCL5 e CCL20 (Bennouna, *et al.*, 2003). Neutrófilos estimulados com LPS e co-cultivados com células dendríticas induziram aumento na expressão de CD40, CD80, MHC classe II e CD86 nas mesmas e a interação de células dendríticas com neutrófilos estimulados por LPS está associada com a síntese de IL-12 e TNF- α (Xiaoxiao *et al.*, 2007). De maneira semelhante, neutrófilos murinos estimulados com *T. gondii* induziram a maturação de células dendríticas e a produção de IL-12 e TNF- α (Bennouna *et al.*, 2005). A co-cultura de neutrófilos estimulados com *Candida albicans* com células dendríticas também levou ao aumento na expressão de CD40 e CD86, tornando-as, portanto, aptas a ativar células T (Megiovanni *et al.*, 2006). Além disso, os autores demonstraram que a aquisição de antígenos pelas células

dendríticas depende do contato direto com neutrófilos e essa aquisição permite que células dendríticas ativem a resposta de células T. Em humanos, neutrófilos ativados induzem à maturação de células dendríticas, o que foi demonstrado pela alta expressão de CD83 e pela produção de IL-12 (Van Gisbergen *et al.*, 2005). Os autores observaram ainda o aumento da capacidade de células dendríticas de estimular a proliferação de células T. No modelo de infecção por *L. major*, neutrófilos de camundongos C57BL/6 liberam CCL3, induzindo a migração de células dendríticas (Charmoy *et al.*, 2010). Por outro lado, Ribeiro-Gomes *et al.* (2012) mostraram que neutrófilos apoptóticos são capturados por células dendríticas da derme, em camundongos C57BL/6. Essa captura atrasou a ativação das células dendríticas e, conseqüentemente, a ativação dos linfócitos, retardando o início da resposta imune adaptativa em resposta à infecção por *L. major*. Assim, o contato entre neutrófilos e células dendríticas pode modular o desenvolvimento de resposta imune eficiente (revisado em Boudaly, 2009).

No modelo murino de infecção por *L. braziliensis* sabemos que há um constante recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção por *L. braziliensis* (de Moura *et al.*, 2005). Ensaio *in vitro* mostraram que o contato entre neutrófilos e macrófagos infectados diminuiu a carga parasitária de macrófagos (Novais *et al.*, 2009). Além disso, a depleção de neutrófilos aumentou a carga parasitária enquanto que a co-inoculação de neutrófilos e *L. braziliensis* diminuiu a carga parasitária. Diante desses resultados, partimos da hipótese que, nesse modelo, os neutrófilos desempenham um papel importante no controle inicial da infecção por *L. braziliensis*.

2 OBJETIVO GERAL

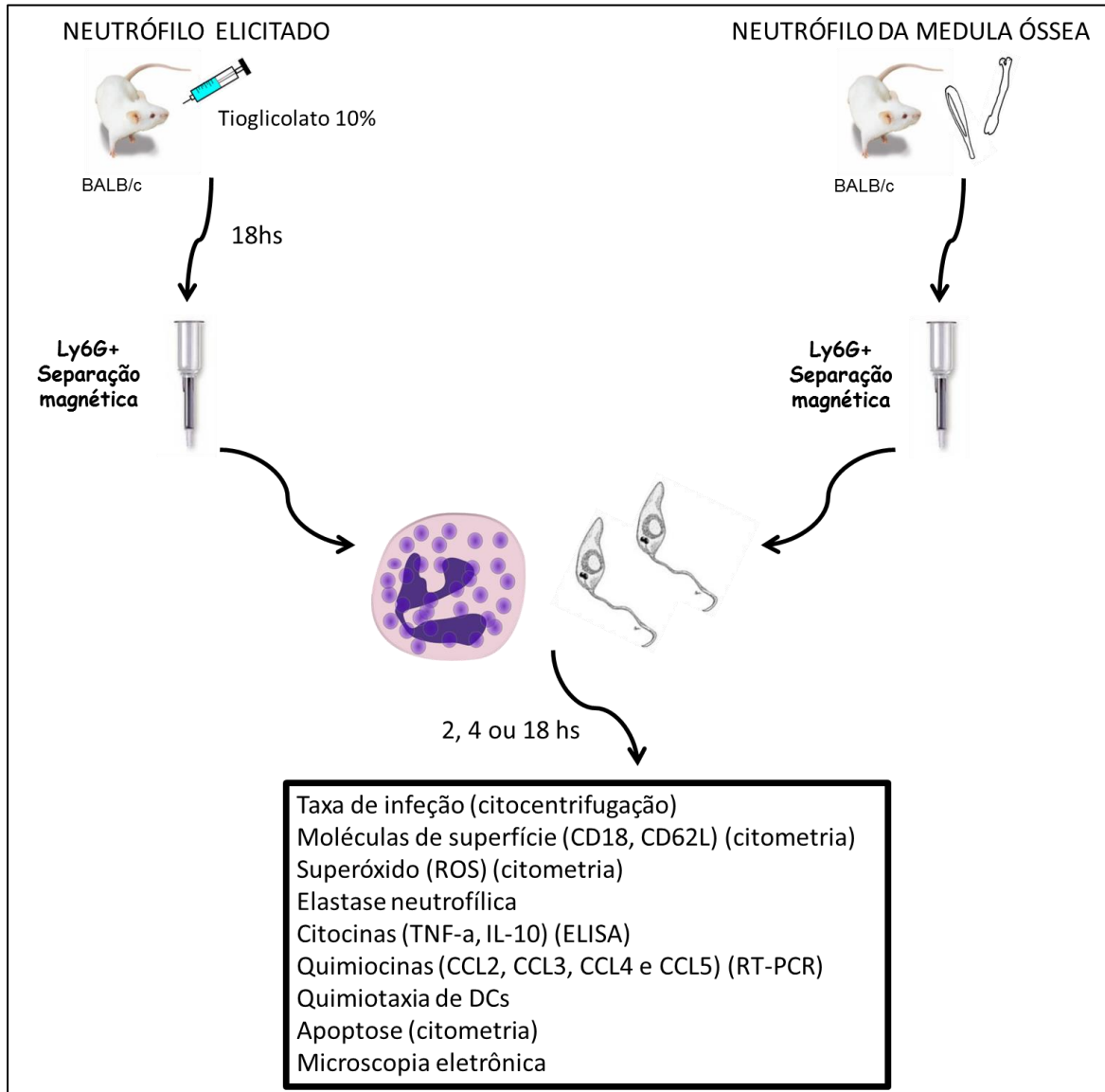
Estudar a interação entre neutrófilos e *Leishmania braziliensis*, empregando um modelo experimental murino.

2.1 Objetivos específicos

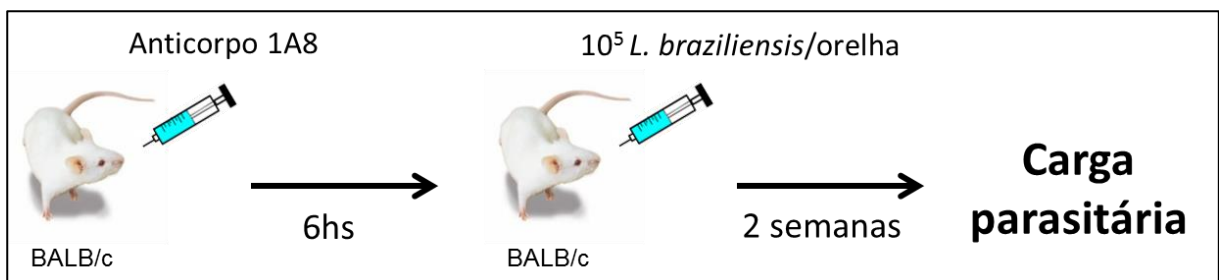
- 1) Quantificar a taxa de infecção de neutrófilos expostos a *L. braziliensis*.
- 2) Avaliar o perfil de expressão de moléculas de superfície, a produção de superóxido e a liberação de elastase neutrofílica em neutrófilos expostos a *L. braziliensis*
- 3) Quantificar a produção de citocinas e a expressão de quimiocinas por neutrófilos expostos a *L. braziliensis*.
- 4) Avaliar a apoptose de neutrófilos infectados com *L. braziliensis*.
- 5) Identificar a capacidade de neutrófilos infectados com *L. braziliensis* de induzir a quimiotaxia de células dendríticas.
- 6) Quantificar a carga parasitária após a infecção de camundongos depletados de neutrófilos.

3 DESENHO EXPERIMENTAL

3.1 Experimentos *in vitro*



3.2 Experimento *in vivo*: Depleção



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos BALB/c, fêmeas, 6-8 semanas de idade, foram obtidas do biotério do CPqGM. Todos os animais foram mantidos em condições livres de patógenos e foram utilizados para experimentação de acordo com o protocolo 003/11 aprovado pelo Comitê de Uso de Animais de Experimentação (CEUA) do CPqGM.

4.2 Parasitas

Neste estudo utilizamos a cepa de *L. braziliensis* BA788 (MHOM/BR/01/BA788) que foi isolada de um paciente com Leishmaniose Tegumentar Americana e foi classificada como sendo *L. braziliensis* por PCR (Castilho *et al.*, 2003). Utilizamos também a cepa BA788 que expressa fluorescência vermelha mCherry, desenvolvida a partir da (MHOM/BR/01/BA788) e gentilmente cedida por Philip Scott (*University of Pennsylvania, Philadelphia, EUA*). Os parasitas foram cultivados a 24°C, em meio Schneider completo (LGC) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de estreptomicina (Gibco).

4.3 Obtenção de neutrófilos

Para a realização desse trabalho, os neutrófilos foram obtidos por recrutamento com tioglicicolato ou foram obtidos diretamente da medula óssea. Para o recrutamento com tioglicicolato, os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de 800µL de tioglicicolato 10% (Sigma) no peritônio de camundongos BALB/c (Bennouna *et al.*, 2003). Após 18 horas, os animais foram eutanasiados e o peritônio foi lavado com 5mL de RPMI (LGC) suplementado com 10% soro bovino fetal (Gibco) e 1% estreptomicina (Gibco) (RPMI completo), com auxílio de uma seringa de 5mL e agulha (22G). As células foram transferidas para uma garrafa de

cultura e incubadas por 1 hora a 37°C na estufa de CO₂ para aderência das células mononucleares. As células não aderentes foram retiradas da garrafa de cultura, filtradas com *cell strainer* de 40µm (BD falcon) , centrifugadas a 461xg por 5 minutos e foram ressuspensas em 1mL de RPMI completo. Após a contagem do número de células, o volume foi ajustado para 5mL e as células foram centrifugadas a 461xg por 5 minutos. Os neutrófilos foram obtidos por separação magnética, empregando o kit de separação magnética de células anti-Ly6G (*Miltenyi Biotec*), seguindo as instruções dos fornecedores. Para tal, as células foram marcadas com anticorpo anti-Ly6G biotinilado por 20 minutos a 4°C, lavadas em tampão MACS (0,5% BSA, 2mM EDTA em PBS 1X, pH 7,2) e, em seguida, foram incubadas com micropérolas magnéticas anti-biotina por 15 minutos na geladeira. Após nova lavagem, os neutrófilos foram submetidos à seleção magnética, empregando-se colunas LS. A coluna foi lavada com tampão MACS e as células Ly6G+, retidas à coluna, foram obtidas após a eluição com 5mL de tampão MACS. As células foram centrifugadas a 461xg por 5 minutos, ressuspensas em 1mL de RPMI completo e contadas para serem ajustadas para uso.

Os neutrófilos da medula óssea foram obtidos da tíbia e fêmur de camundongos BALB/c, após eutanásia. Os ossos foram macerados com auxílio de cadinho, em 1mL de RPMI completo. As células foram centrifugadas a 461xg por 5 minutos, ressuspensas em 5mL de tampão de lise de hemácias ACK (0,83% NH₄Cl 0,15M, 0,1% KHCO₃ 1 mM, 0,04% Na₂ EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) e incubadas a 4°C. Após 4 minutos, foram adicionados 5mL de RPMI completo para parar a reação de lise e as células foram filtradas com *cell strainer* de 40µm (BD falcon). As células foram centrifugadas a 461xg por 5 minutos, ressuspensas em tampão MACS contendo anticorpo anti-Ly6G biotinilado, seguido de separação magnética, conforme descrito acima. Em alguns experimentos, a separação magnética de neutrófilos foi feita com anticorpo anti-Ly6G conjugado a FITC (clone 1A8) ou anti-NIMP conjugado a FITC (clone NIMP-R14). Nesses casos as esferas magnéticas utilizadas continham anticorpo anti-FITC.

O grau de pureza da separação dos neutrófilos foi avaliado por meio da marcação das células com anticorpo Ly6G (que reconhece especificamente neutrófilo) conjugado a FITC (BD Pharmingen). As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho *FACSort* (Becton-Dickinson) e foram analisadas utilizando-se o programa FlowJo (Tree Star) versão 7.6.5. O grau de pureza também foi

determinado por meio de contagem de células mononucleares e polimorfonucleares, realizadas no microscópio ótico em lente de imersão. As lâminas foram preparadas por citocentrifugação e coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

4.4 Infecção de neutrófilos

Os promastigotas de *L. braziliensis* em fase estacionária foram opsonizadas com 5% de soro fresco de camundongo *naive* em meio RPMI incompleto e incubados por 30 minutos a 24°C. Após incubação, os parasitas foram adicionados aos poços da placa de cultura sem que houvesse troca do meio. Os neutrófilos (10^6 neutrófilos) foram infectados com *L. braziliensis* (na proporção de 2 *L.b* :1 NEUTRÓFILO), foram plaqueados em placa de fundo chato (Nunc) e mantidos por 2, 4 ou 18 horas a 37°C na estufa de CO₂.

4.5 Taxa de infecção

A taxa de infecção foi determinada por meio de contagem de células em lâminas. Após a infecção, as lâminas foram preparadas por citocentrifugação (Thermo electron Corporation) e coradas com H&E. As contagens foram realizadas no microscópio ótico em lente de imersão. Foram contados os números de neutrófilos infectados e o número de amastigotas presentes em um total de 100 células por cada lâmina. A taxa de infecção também foi determinada por citometria de fluxo, quando os neutrófilos foram infectados com *L. braziliensis* mCherry, por meio da determinação da expressão da fluorescência vermelha.

4.6 Detecção da expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo

Inicialmente, os neutrófilos foram infectados como descrito acima. As células foram então lavadas com tampão FACS (0,5% Soro bovino fetal, 0,01% Azida em PBS 1X) e foram bloqueadas com *Fc Block* (CD16/CD32) (BD Pharmingen). As marcações foram feitas com os seguintes anticorpos: anti-Ly6G conjugado a Alexa

fluor 647 (clone 1A8, eBioscience) ou anti-NIMP (clone NIMP-R14, gentilmente cedido por Fabienne Tacchini-Cottier – Unil, Lausanne, Suíça), anti-CD18 conjugado a FITC (eBioscience) ou a PE (eBioscience) e anti-CD62L conjugado a FITC (BD Pharmingen) ou a PE (eBioscience). Como controle, cultivamos as células com 100µg/mL de zymosan (SIGMA). Ao término da marcação, as células foram lavadas tampão FACS e ressuspendidas em tampão FACS e foram adquiridas no aparelho *FACSAria* (BD). A análise foi feita utilizando-se o programa *FlowJo* versão 7.6.5 (Tree Star).

4.7 Detecção da produção de superóxido

Os neutrófilos foram infectados como descrito acima. Após 2 horas de infecção, a placa contendo as células infectadas foram centrifugadas a 461xg por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspendidas em PBS 1X e novamente centrifugadas. No escuro, a sonda Dihydroethidium (DHE) (Invitrogen) foi diluída em PBS 1X e utilizada na concentração final de 3µM. A placa foi incubada por 30 minutos a 37°C na estufa de CO₂. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 461xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200uL/poço de PBS 1X, essa lavagem foi repetida mais uma vez. Após centrifugação, as células foram ressuspendidas em 100uL/poço de tampão FACS. As células foram adquiridas no aparelho *FACSsort* (Becton-Dickinson). A análise foi feita utilizando-se o programa *FlowJo* versão 7.6.5 ou 9.5.3 (Tree Star).

4.8 Detecção de elastase neutrofílica

Os neutrófilos foram infectados como descrito acima. Após 4 horas de infecção, a placa com as células foi centrifugada a 461xg por 5 minutos. O sobrenadante fresco foi coletado para a determinação da atividade enzimática da elastase. Para a análise de elastase, 50µL do sobrenadante foram misturados a 25µL do tampão RB (0,1 M HEPES, 0,5 M NaCl, 10% dimethylsulfóxido, pH 7.5). Posteriormente, foram adicionados 150µL de substrato I colorimétrico da elastase a 1mM (Calbiochem). A placa foi incubada a 37°C por 4 dias. A atividade da elastase

foi mensurada pela leitura na absorbância a 410nm e compara com uma curva construída a partir de diluições seriadas de padrão (USBiological), conforme descrito em Ribeiro-Gomes *et al.* (2007).

4.9 Detecção de citocina por ELISA ou CBA

Os neutrófilos foram infectados como descrito acima. Após 2 ou 24 horas, a placa com as células foi centrifugada a 461xg por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado para dosagem de citocina TNF- α . Os níveis de citocinas presentes nos sobrenadantes foram determinados por ELISA utilizando-se *kit* comercial (R&D Systems) ou por *Cytometric Bead array* (CBA) (kit inflamatório) (BDpharmingen), de acordo com as instruções dos fornecedores.

4.10 Expressão de quimiocinas por PCR em tempo real

Após a infecção dos neutrófilos com *L. braziliensis* ou o tratamento com 40ng/mL LPS (Invivogen), como controle positivo, por 2 horas, foi feita a extração do RNA total utilizando-se o kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em 350 μ L por 5×10^6 células de tampão RLT, quantificado em espectrofotômetro e armazenado em freezer -70°C até o momento de uso. Para a síntese de cDNA, utilizamos o kit SuperScript III (Invitrogen), 200ng de RNA total e 0,5 μ g de *Random Primer* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram efetuadas no termociclador modelo Mastercycler Gradient (Eppendorf). Após a síntese, o cDNA foi armazenado a -20C até a sua utilização nos ensaios de PCR em tempo real. As reações de PCR em Tempo Real foram preparadas em mix com volume final de 20 μ L, contendo 1X do reagente fluoróforo SYBR[®] Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), iniciadores CCL3: CGGAAGATTCCACGCCAATTC (*sense*), GGTTGAGGAACGTGT CCTGAAG (*antisense*); CCL4: CCCACTTCCTGCTGTTTCTCTTAC (*sense*), AGCA GAGAAACAGCAATGGTGG (*antisense*) (Bennouna et al., 2003) e 1 μ L de cDNA. As reações foram realizadas em triplicatas, em placas de 96 poços (96 *well optical*

reaction plate, Applied Biosystems). As corridas foram realizadas em equipamento 7500 Real Time PCR System, programa 7500 System SDS Software, opção “Relative Quantification”, obedecendo as seguintes condições: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 94°C e 1 minuto a 60° C. Após corrida, foi realizada a dissociação da reação no programa “Dissociation”, no mesmo equipamento.

4.11 Quimiotaxia de células dendríticas

A obtenção das células dendríticas a partir da medula óssea foi feita como descrito em Lutz *et al.* (1998). Os ossos (tíbia e fêmur) de camundongos BALB/c foram removidos para a obtenção da medula óssea. A suspensão celular resultante foi filtrada e as células foram ressuspensas em meio RPMI completo suplementado com 20ng/mL de GM-CSF (Peprotech). Em seguida, 2–5 x 10⁶ células por 10mL foram colocadas em placas de Petri, as quais foram incubadas na estufa a 37°C, 5% CO₂ por 7 dias. No dia 3, foram adicionados 8-10mL de meio RPMI completo suplementado com GM-CSF. No dia 6, foi feita nova troca de meio. No dia 7, as células CD11c+ foram separadas segundo o protocolo *CD11c Microbeads* (Milteny eBiotec) foram lavadas com PBS 1X e foram caracterizadas quanto à expressão de CD11c, CD86 e MHCII por citometria de fluxo (Figura 4).

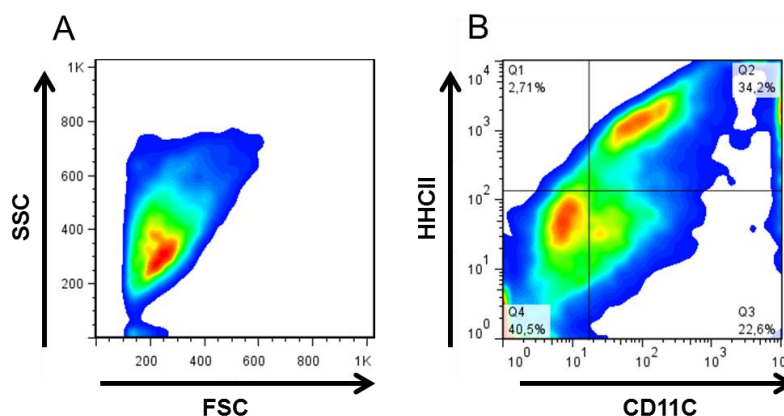


Figura 4: Fenotipagem das células dendríticas. Células dendríticas CD11c+ obtidas da medula óssea e magneticamente separadas foram marcadas com anticorpos CD11c, CD86 e MHC classe II. (A) Células selecionadas por tamanho e granulosidade, (B) células CD11c+MHCII+.

O ensaio de quimiotaxia foi desenvolvido numa placa especial para quimiotaxia ChemoTX (Neuro Probe). No fundo do poço foi colocado o sobrenadante de neutrófilos infectados com *L. braziliensis* por 2 horas. Acima do sobrenadante foi colocada uma membrana, que permite a passagem de células, e, em cima da membrana, foram colocadas 10^5 DCs por poço ressuspendidas em meio RPMI completo. A placa foi incubada a 37°C e, após 2 horas, as células que migraram para a parte de baixo da membrana foram contadas. Como controle negativo foi avaliada a migração randômica de células dendríticas em direção aos poços contendo meio RPMI puro e como controle positivo, a migração em direção ao estímulo de 100ng/mL de LPS (Invivogen). O índice quimiotático foi calculado pela razão entre o número de células que migraram em direção aos sobrenadantes das culturas pelo número de células que migraram randomicamente em direção ao meio RPMI puro (Van Zandbergen *et al.*, 2004).

4.13 Microscopia eletrônica

Os neutrófilos foram infectados como descrito acima. Como controle positivo os neutrófilos foram tratados com etoposide (10 μ M) (SIGMA). Após 18 horas de infecção, as células foram fixadas com 2% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4 por 2 horas a temperatura ambiente (TA). As amostras foram lavadas 2 vezes com tampão cacodilato de sódio. Os lipídeos foram fixados com tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato de sódio por 1 hora a TA. Após a lavagem com cacodilato de sódio, as células foram desidratadas com consecutivos banhos de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) por 15 minutos cada um, a TA. A substituição foi feita com acetona 100% e resina polybed (1:1) e as células foram incubadas *overnight* a TA. Em seguida, a impregnação foi feita com a resina pura por 6 horas a TA. A polimerização foi realizada na estufa a 60°C por 3 dias. As sessões foram examinadas e fotografadas usando um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss).

4.14 Apoptose

Os neutrófilos foram infectados como descrito acima. Após 18 horas, as células foram lavadas, bloqueados com *Fc Block* (CD16/CD32) (BD Pharmingen) e foram, em seguida, marcadas com anti-1A8 conjugado a PE 1:1000 (BD Pharmingen), foi adicionado 3µL por amostra de Anexina V FITC (Biolegend) e DAPI 1:50 (SIGMA). Como controle positivo, células foram tratadas com radiação ultra violeta (UV) por 30 minutos. Ao término da marcação, as células foram lavadas e ressuspendidas em tampão FACS e foram adquiridas no aparelho FACS LSR Fortessa (BD Bioscience). A análise foi feita utilizando-se o programa *FlowJo* versão 9.5.3 (Tree Star).

4.15 Depleção de neutrófilos

Para a depleção de neutrófilos, os camundongos BALB/c foram injetados uma vez com 250µg/mL do anticorpo 1A8 (Bioxcell), via intra peritoneal. Após 6 horas, foi feita a infecção com *L. braziliensis*. Para tal, os animais foram anestesiados e infectados, na derme da orelha esquerda, com 10⁵ promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788), em fase estacionária, em volume de ~10µL, utilizando-se uma agulha 27 1/2G. A evolução da lesão foi monitorada por meio da mensuração do espessamento da orelha utilizando-se um paquímetro digital (Mitutoyo). A neutropenia sanguínea foi confirmada por meio da contagem de leucócitos em esfregaço sanguíneo corado com H&E. Como controle, camundongos foram tratados com 250 µg/mL de IgG total de rato (SIGMA).

4.17 Carga parasitária

A carga parasitária foi quantificada por meio da técnica de diluição limitante (Hondowicz & Scott, 2002). Suspensões de células do linfonodo retromaxilar de drenagem e orelha foram removidas e preparadas assepticamente após a infecção. Foram feitas diluições seriadas das células e estas foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo meio Schneider completo (LGC) suplementado com 10% de soro

fetal bovino (Gibco) e 1% de estreptomicina (Gibco). O número de parasitas foi determinado a partir da maior diluição na qual os parasitas foram encontrados após 7 dias de incubação.

4.18 Análise estatística

Os dados representam as médias \pm erro padrão das médias. A significância dos resultados foi calculada por meio do teste t (Mann-Whitney) utilizando-se o programa Prism (GraphPad) e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Pureza da obtenção de neutrófilos e taxa de infecção com *L. braziliensis*

Inicialmente, realizamos experimentos com neutrófilos recrutados por injeção intraperitoneal de tioglicolato, que foram, posteriormente, enriquecidos por seleção magnética. A pureza da preparação foi avaliada por citometria de fluxo e obtivemos, em média, 76,2% de neutrófilos Ly6G+ (Figura 5A). A citocentrifugação e a contagem de lâminas coradas com H&E, por microscopia ótica, confirmou esse achado: encontramos 20% de células mononucleares e 80% de neutrófilos (Figura 5B). Na Figura 5C, podemos observar o aspecto maduro dos neutrófilos.

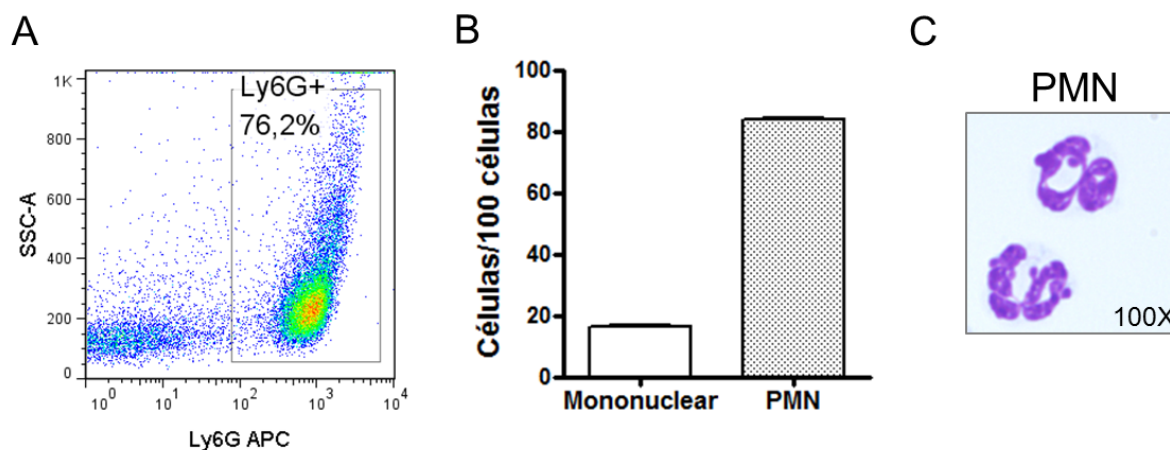


Figura 5: Pureza dos neutrófilos obtidos de animais estimulados com tioglicolato. Camundongos BALB/c receberam tioglicolato e os neutrófilos recrutados foram enriquecidos por separação magnética. (A) A pureza foi avaliada por citometria de fluxo e (B) pela contagem de lâminas preparadas por citocentrifugação e coradas com H&E. O número de neutrófilos foi determinado em um total de 100 células. (C) Amostra representativa de uma preparação de neutrófilos. Os dados mostrados são de um experimento representativo de três experimentos.

A partir da padronização do protocolo de obtenção dos neutrófilos por meio do recrutamento com tioglicolato, partimos para avaliar a carga parasitária. Para isso, os neutrófilos foram expostos aos parasitas opsonizados e, após diferentes tempos de incubação, determinamos a carga parasitária em lâminas de citocentrifugação

coradas com H&E. Em uma hora de exposição, observamos 40% de neutrófilos infectados, sem sofrer grandes alterações após duas, três e quatro horas (Figura 6A). Contamos cerca de 50 parasitas internalizados (por 100 células) após uma hora; esse valor passou para 70 após duas horas e com três e quatro horas não houve alteração significativa (Figura 6B). Neutrófilos infectados nos diferentes tempos podem ser observados na figura 6C. Como não observamos diferenças significativas nas taxas de infecção entre os tempos de uma a três horas, o tempo de duas horas foi escolhido para os ensaios subsequentes.

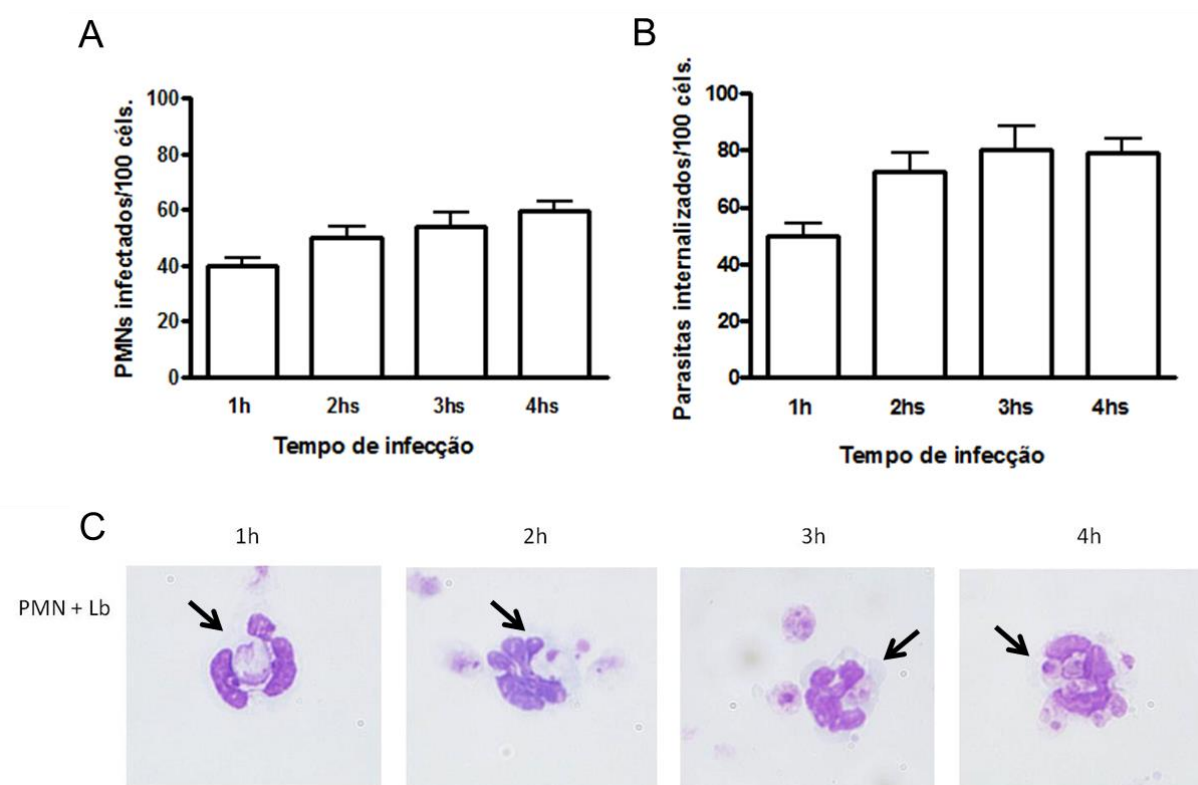


Figura 6: Cinética de infecção de neutrófilos do peritônio por *L. braziliensis*.

Camundongos BALB/c receberam tioglicolato e os neutrófilos recrutados foram enriquecidos por separação magnética. Os neutrófilos foram expostos por diferentes tempos às *L. braziliensis* opsonizadas. As lâminas foram coradas com H&E e avaliadas para determinarmos o número de (A) neutrófilos infectados e (B) de parasitas internalizados por 100 células. (C) Amostras representativas de neutrófilos infectados. Os dados mostrados são de um experimento em triplicata representativo de três experimentos. Dado mostrado como média \pm SEM.

5.2 Expressão de moléculas de superfície CD18 e CD62L e produção de superóxido em neutrófilos expostos a *L. braziliensis*

Para avaliarmos a expressão de moléculas de superfície, os neutrófilos foram expostos a *L. braziliensis* e, após 2h, as células foram marcadas simultaneamente com anti-Ly6G, anti-CD18 e anti-CD62L. Inicialmente, as células foram selecionadas por tamanho e granulosidade e, em seguida, pela expressão de Ly6G+ (Figura 7A). Dentro da população Ly6G+, determinamos a expressão de CD18, que foi maior na população exposta a *L. braziliensis* (97,4%) do que nos neutrófilos incubados sem o parasita (controle) (Figura 7B). A expressão de CD62L foi ligeiramente maior nos neutrófilos incubados na presença de *L. braziliensis*, quando comparado com os neutrófilos controle (Figura 7C). Como controle negativo, utilizamos células marcadas com um isotipo (Figura 7D) e como controle positivo para o ensaio, utilizamos neutrófilos incubados com Zymozan (Figura 7E e 7F). Assim, observamos que a exposição de neutrófilos à *L. braziliensis* opsonizada aumenta significativamente a expressão de CD18 (Figura 7E) enquanto que não houve modulação na expressão de CD62L (Figura 7F).

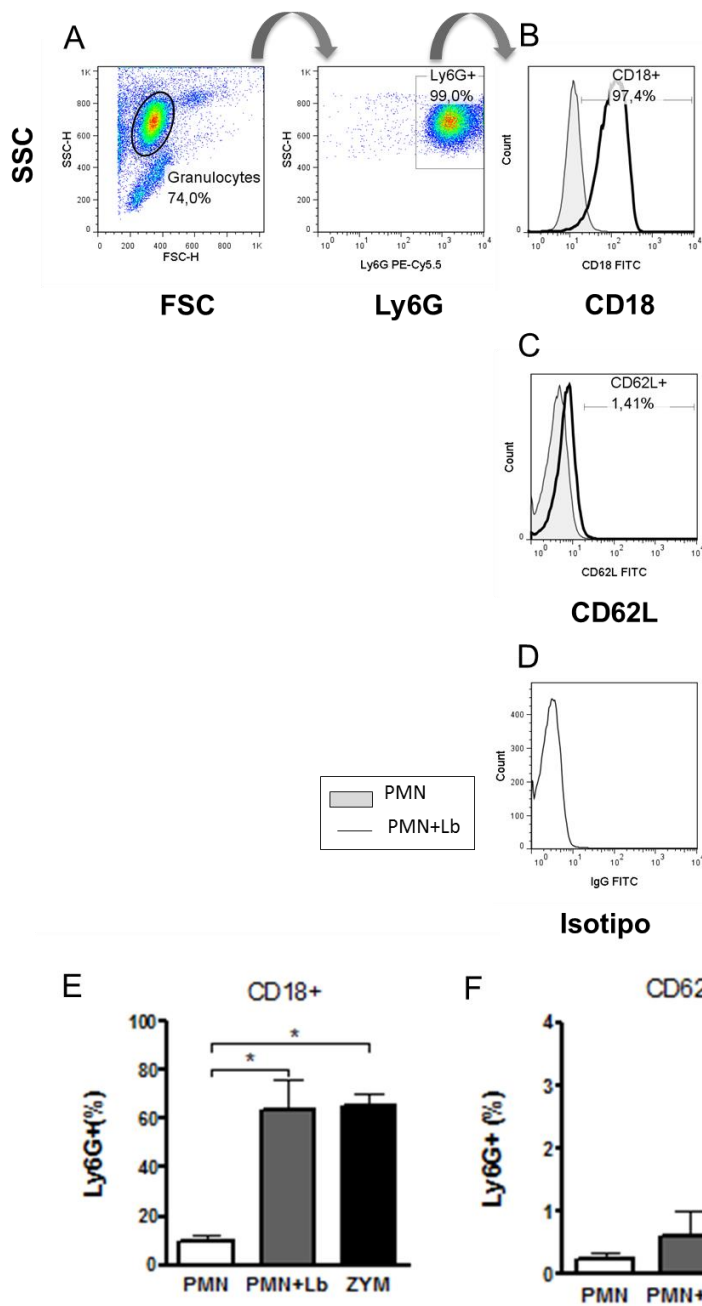


Figura 7: Neutr3filos do perit3nio expostos a *L. braziliensis* expressam CD18 e CD62L. Camundongos BALB/c receberam tioglicolato e os neutr3filos recrutados foram enriquecidos por separa3o magn3tica. Os neutr3filos foram expostos 3s *L. braziliensis* opsonizadas. Ap3s 2 horas, os neutr3filos foram marcados com anti-Ly6G e anti-CD18 ou anti-CD62L. (A) Estrat3gia de sele3o de neutr3filos por tamanho, granulossidade e express3o de Ly6G. A express3o de (B) CD18 e (C) CD62L foi determinada por citometria de fluxo. (D) C3lulas marcadas com anticorpo isotipo. Porcentagem de c3lulas controle (PMN), expostas a *L. braziliensis* (Lb) ou expostas a Zymozan (Zym) com fluoresc3ncia positiva para (E) CD18 e (F) CD62L. Os dados mostrados foram compilados de tr3s experimentos, cada experimento em triplicata. Dado mostrado como m3dia \pm SEM. * $p < 0.05$.

Em seguida, avaliamos como os neutrófilos respondem à *L. braziliensis*, em termos de produção de ROS. A produção de superóxido pelos neutrófilos expostos a *L. braziliensis* foi determinada após duas horas de incubação, por citometria de fluxo. Como anteriormente, os neutrófilos foram selecionados por tamanho e granulosidade e, então, foi observada a média de intensidade de fluorescência das células incubadas com a sonda DHE, que detecta a presença de superóxido intracelular. Na presença de *L. braziliensis*, houve um aumento significativo na produção de superóxido, diferente do observado em neutrófilos incubados na ausência de parasitas (Figura 8A e C). Como controle positivo, utilizamos neutrófilos tratados com PMA, os quais também apresentaram uma média de intensidade de fluorescência significativamente maior (Figura 8B e C).

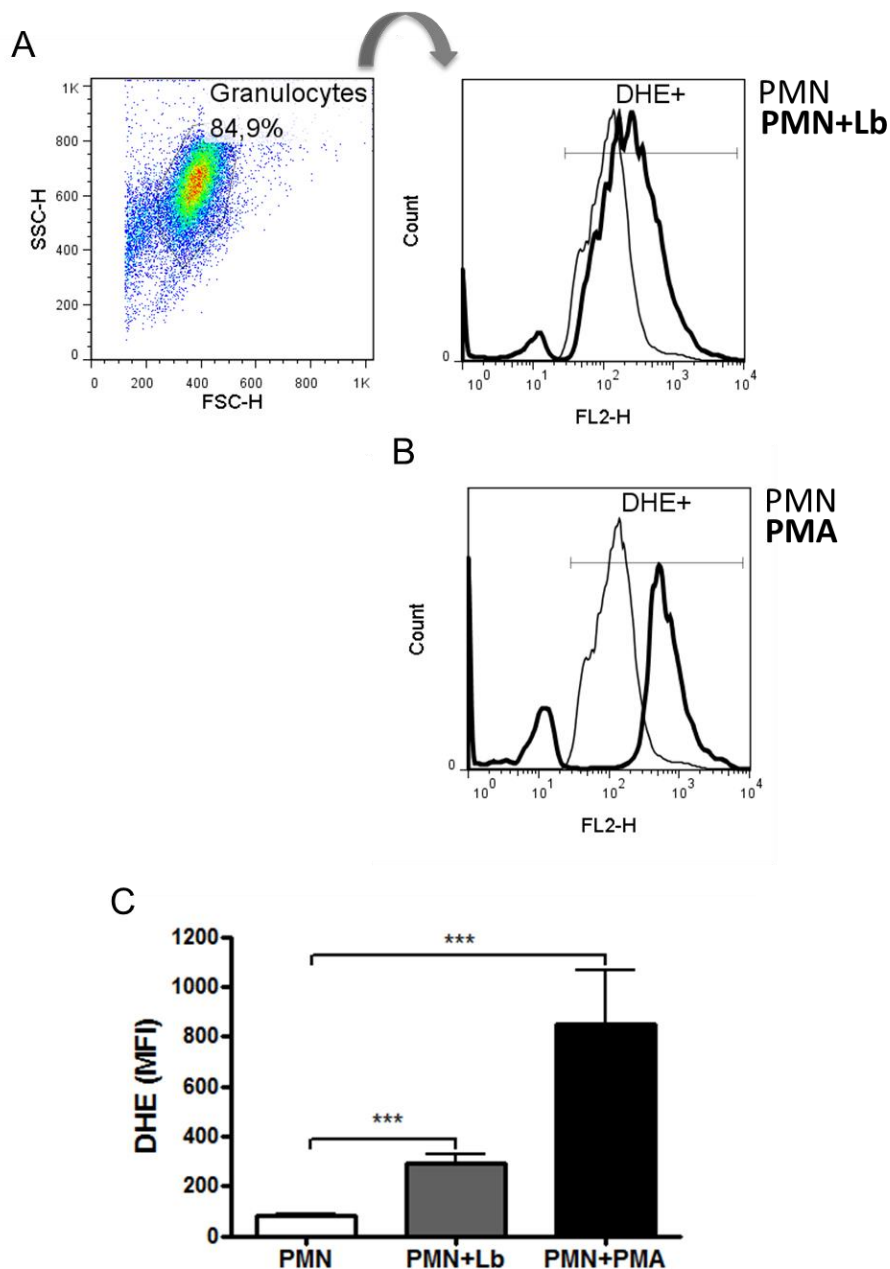


Figura 8: Neutr3filos do perit3nio expostos a *L. braziliensis* produzem super3xido. Camundongos BALB/c receberam tioglicolato e os neutr3filos recrutados foram enriquecidos por separa33o magn3tica. Os neutr3filos foram expostos *L. braziliensis* opsonizadas. Ap3s duas horas, a produ33o de super3xido foi determinada por citometria de fluxo. (A) Sele33o dos neutr3filos por tamanho e granulossidade e m3dia de intensidade de fluoresc3ncia de c3lulas expostas (PMN+Lb) e de c3lulas controle (PMN). (B) M3dia de intensidade de fluoresc3ncia de c3lulas estimuladas com PMA e de c3lulas controle (PMN). (C) Representa33o gr3fica das m3dias de intensidade de fluoresc3ncia, compiladas de tr3s experimentos diferentes, cada experimento em triplicata. Dado mostrado como m3dia \pm SEM. *** $p < 0.0001$.

5.3 Liberação de elastase neutrofílica, TNF-a e quimiocinas por neutrófilos expostos a *L. braziliensis*

A partir da observação que o neutrófilo modula a expressão de CD18 e produz superóxido em resposta à *L. braziliensis*, passamos a avaliar outras moléculas potencialmente produzidas pelo neutrófilo. Como mostrado na Figura 9, a presença de *L. braziliensis* induziu um aumento significativo da liberação de elastase neutrofílica, após quatro horas de incubação com parasitas opsonizados.

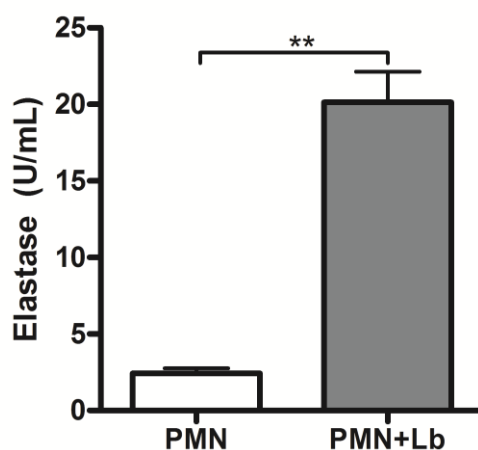


Figura 9: Neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis* secretam elastase neutrofílica. Camundongos BALB/c receberam tioglicolato e os neutrófilos recrutados foram enriquecidos por separação magnética. Os neutrófilos foram expostos à *L. braziliensis* opsonizadas. A produção de elastase foi avaliada após quatro horas por ensaio colorimétrico. Os resultados são compilados de três experimentos, cada experimento em triplicata. ** $p < 0.01$. Dado mostrado como média \pm SEM.

Observamos também a produção de TNF-a foi significativamente menor em neutrófilos expostos a *L. braziliensis* por duas horas, quando comparado com neutrófilos controle, incubados na ausência de parasitas (Figura 10).

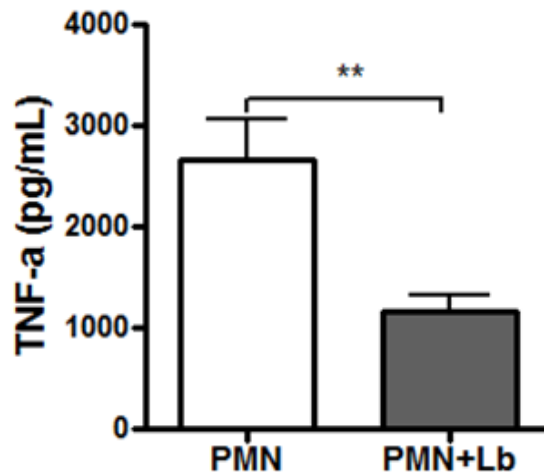


Figura 10: Baixos níveis de TNF-a por neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c receberam tioglicolato e os neutrófilos recrutados foram enriquecidos por separação magnética. Os neutrófilos foram expostos às *L. braziliensis* opsonizadas. Após duas horas, a produção de TNF-a foi avaliada por CBA. O dado mostrado é de experimento em triplicata representativo de três experimentos. Dado mostrado como média \pm SEM. ** $p < 0.01$.

5.5 Expressão de quimiocinas CCL3 e CCL4 por neutrófilos expostos a *L. braziliensis* e recrutamento de células dendríticas

Por fim, avaliamos a expressão das quimiocinas CCL3 e CCL4 pelos neutrófilos expostos aos parasitas. Por PCR em tempo real, observamos que, após duas horas de incubação com *L. braziliensis*, houve um aumento na expressão de CCL3 (Figura 11A) e de CCL4 (Figura 11B).

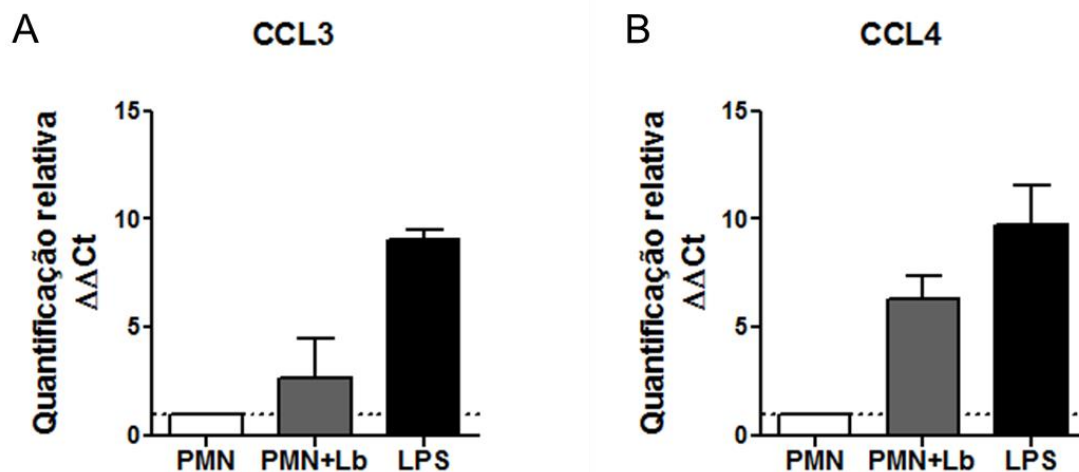


Figura 11: Neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis* secretam CCL3 e CCL4. Camundongos BALB/c receberam tioglicolato e os neutrófilos recrutados foram enriquecidos por separação magnética. Os neutrófilos foram expostos às *L. braziliensis* opsonizadas. Após duas horas, o RNA foi extraído para a confecção do cDNA, o qual foi utilizado em ensaios de PCR em tempo real para determinamos a expressão de (A) CCL3 e de (B) CCL4. Os dados mostrados são de um experimento em triplicata representativo de três experimentos. Dado mostrado como média \pm SEM.

Com base no resultado anterior, avaliamos se as quimiocinas CCL3 e CCL4 (Figura 11), secretadas pelos neutrófilos, seriam capazes de induzir quimiotaxia de células dendríticas. Assim, as células dendríticas foram diferenciadas de precursores da medula óssea de camundongos e caracterizadas quanto à expressão de CD11c, MHC classe II e CD86 (Figura 4). Em seguida, as mesmas foram utilizadas no ensaio de quimiotaxia empregando os sobrenadantes de cultura de neutrófilos expostos a *L. braziliensis* (Figura 12A). A quimiotaxia de células dendríticas foi significativamente maior na presença de sobrenadantes de cultura de neutrófilos expostos a *L. braziliensis* (Figura 12B), quando comparado com sobrenadantes da cultura controle.

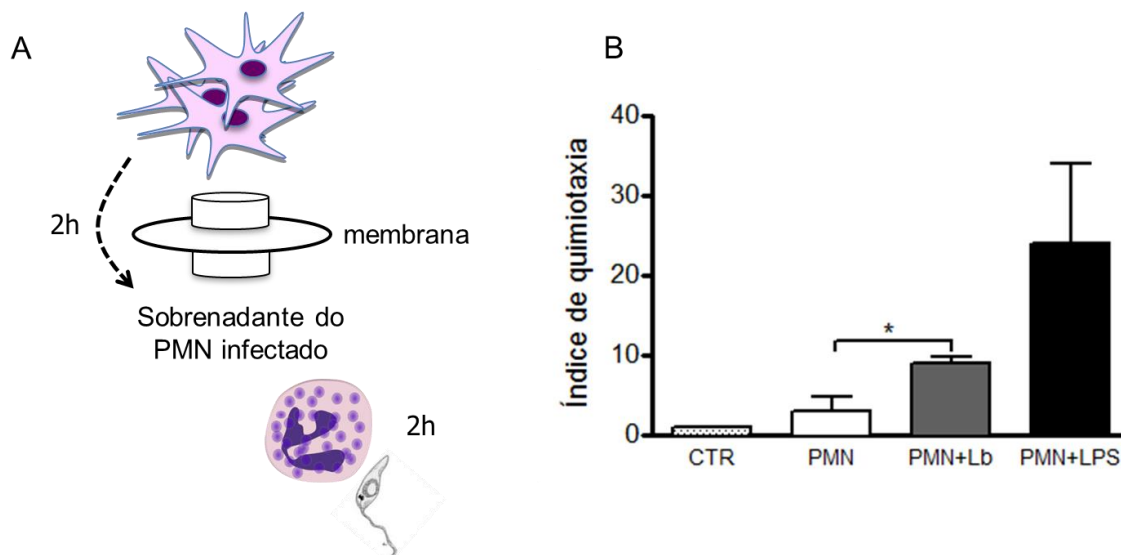


Figura 12: Neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis* induzem quimiotaxia de células dendríticas. Os neutrófilos foram expostos por duas horas às *L. braziliensis* opsonizadas. (A) O ensaio de quimiotaxia consistiu no cultivo de células dendríticas com o sobrenadante de cultura de neutrófilos expostos a *L. braziliensis*. (B) O índice quimiotático foi determinado após duas horas de cultura. CTR, meio; PMN, sobrenadante da cultura de neutrófilos mantidos na ausência de parasitas; PMN+Lb, sobrenadante da cultura de neutrófilos expostos à *L. braziliensis* ou a LPS (PMN+LPS). O dado mostrado é um compilado de três experimentos, cada experimento em triplicada. Dado mostrado como média \pm SEM. * $p < 0.05$.

5.6 Pureza da obtenção de neutrófilos da medula óssea e taxa de infecção de neutrófilos infectados com *L. braziliensis*

A estimulação do peritônio com uma substância irritante, como o tioglicolato, resulta no recrutamento de macrófagos inflamatórios e funcionalmente diferentes das células residentes (Zhang *et al.*, 2008). Além disso, neutrófilos ativados diminuem a expressão de CD62L, enquanto que sua expressão é elevada em neutrófilos basais (Laufs *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009). Alta expressão de CD62L não foi observada nos neutrófilos obtidos do peritônio pelo estímulo do tioglicolato e não expostos à *L. braziliensis* (Figura 7C e F). Por isso, realizamos experimentos semelhantes aos já descritos, empregando neutrófilos obtidos da medula óssea de camundongo. O nosso objetivo foi comprovar os efeitos induzidos nos neutrófilos pela *L. braziliensis* e avaliar se haveria diferença na magnitude dos resultados.

Como anteriormente, determinamos a pureza da população por citometria de fluxo. Como mostrado na Figura 13A, obtivemos 91,7% de neutrófilos Ly6G+. Quando avaliamos as lâminas coradas com H&E, por microscopia ótica, observamos a presença de aproximadamente 10% de células mononucleares e 90% de neutrófilos (Figura 13B). Na figura 13C, observamos o aspecto dos neutrófilos obtidos por esse método.

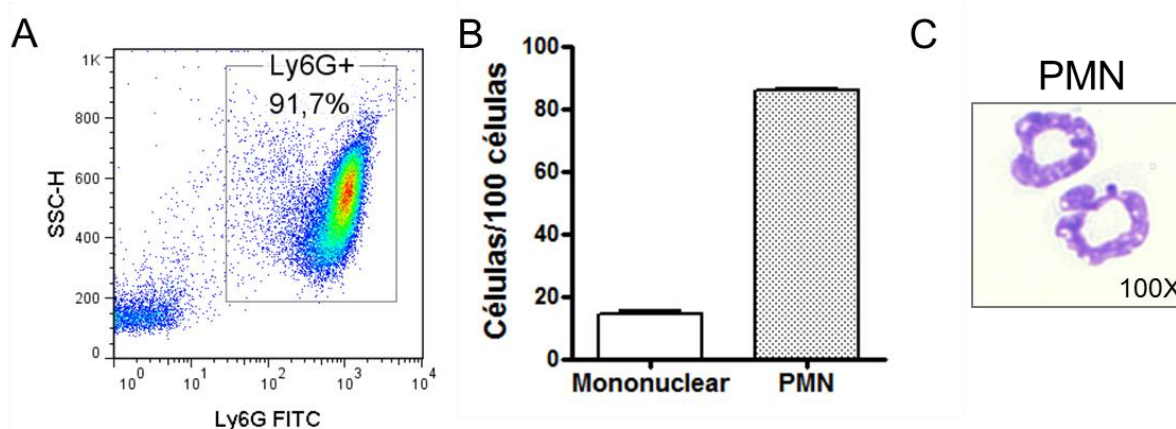


Figura 13: Pureza da separação magnética de neutrófilos Ly6G+ derivados da medula óssea. Os neutrófilos foram obtidos da medula de camundongos BALB/c e foram enriquecidos por separação magnética. (A) A pureza foi avaliada por marcação com anticorpo anti-Ly6G e analisada por citometria de fluxo. (B) Lâminas foram marcadas com H&E e avaliadas quanto ao número de neutrófilos por 100 células. (C) Amostra representativa de neutrófilos obtidos.

Os neutrófilos obtidos da medula óssea foram então expostos por diferentes tempos às promastigotas de *L. braziliensis* opsonizadas. Após a contagem das lâminas, observamos que após uma hora de exposição há 20% de neutrófilos infectados e após duas horas, esse percentual não sofreu alterações significantes. Essa porcentagem se manteve constante nos tempos subsequentes (três e quatro horas) (Figura 14A). O índice de parasitas internalizados em uma hora foi de aproximadamente 25, sem que houvesse alterações significantes após duas, três e quatro horas (Figura 14B). Neutrófilos infectados representativos dos tempos uma a quatro horas podem ser observados na Figura 14C. Comparados aos dados obtidos com neutrófilos elicitados por tioglicolato (Figura 6A), observamos que a taxa de infecção de neutrófilos é maior em neutrófilos elicitados.

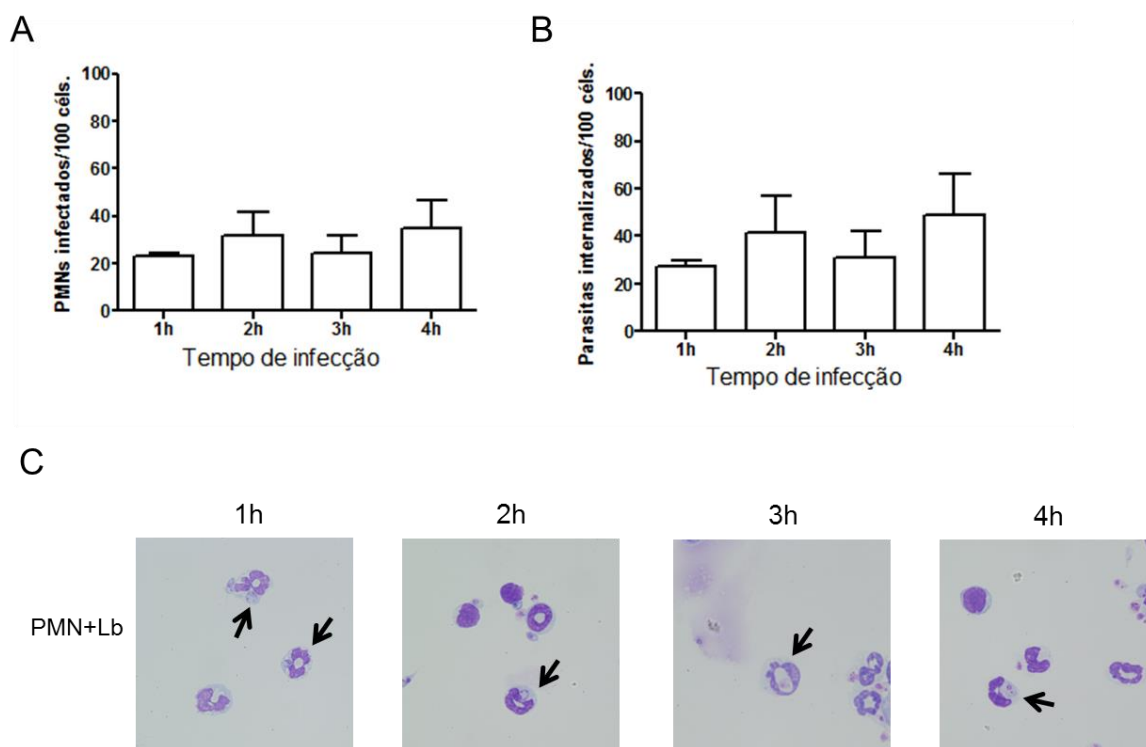


Figura 14: Cinética de infecção de neutrófilos obtidos da medula óssea por *L. braziliensis*. Os neutrófilos obtidos da medula óssea foram enriquecidos por separação magnética e expostos às *L. braziliensis* opsonizadas. As lâminas foram coradas com H&E e avaliadas quanto ao número de (A) neutrófilos infectados e (B) de parasitas internalizados por 100 células. (C) Amostras representativas de neutrófilos infectados. Os dados mostrados são de um experimento em triplicata representativo de três experimentos. Dado mostrado como média \pm SEM.

5.7 Expressão de moléculas de superfície CD18 e CD62L em neutrófilos da medula óssea infectados com *L. braziliensis* e neutrófilos *bystander*

Em seguida, determinamos a expressão de CD18 e de CD62L, em neutrófilos da medula óssea. Nesse experimento, utilizamos uma cepa de *L. braziliensis* fluorescente (mCherry), o que nos permitiu determinar simultaneamente a intensidade da fluorescência das moléculas na superfície celular e a taxa de infecção. Assim, os neutrófilos foram cultivados com *L. braziliensis* mCherry por duas horas e, posteriormente, foram marcados com anti-CD18 e anti-CD62L.

Inicialmente, selecionamos as células por tamanho e granulosidade e, dentro desta população, demarcamos as células Ly6G⁺ (Figura 15A). Em seguida, identificamos duas sub-populações de neutrófilos: uma população não infectada (mCherry⁻) e outra infectada (mCherry⁺) (Figura 15A). A porcentagem de neutrófilos infectados, avaliada por citometria de fluxo, chegou a 48% (Figura 15B). A expressão de CD18 e CD62L foi determinada nos neutrófilos não expostos (mantidos na ausência do parasita), assim como na sub-população exposta ao parasita mas que não foi infectada (*bystander*/mCherry⁻) e, por último, na sub-população de neutrófilos infectados (mCherry⁺). Houve um aumento visível na expressão de CD18, nos neutrófilos mCherry⁺ quando comparado com a população não exposta e com a população *bystander*/mCherry⁻ (Figura 15C). A expressão de CD62L diminuiu após a infecção com *L. braziliensis* (mCherry⁺) (Figura 15D) e um efeito similar foi observado em células expostas ao parasita mas não infectadas (mCherry⁻) (Figura 15D). Por outro lado, neutrófilos não expostos (mantidos na ausência do parasita), apresentaram expressão de CD62L elevada. Comparando esses resultados com os dados obtidos com neutrófilos elicitados por tioglicolato (Figura 7), a expressão de CD18 foi igualmente aumentada após a infecção enquanto que não houve aumento na expressão de CD62L.

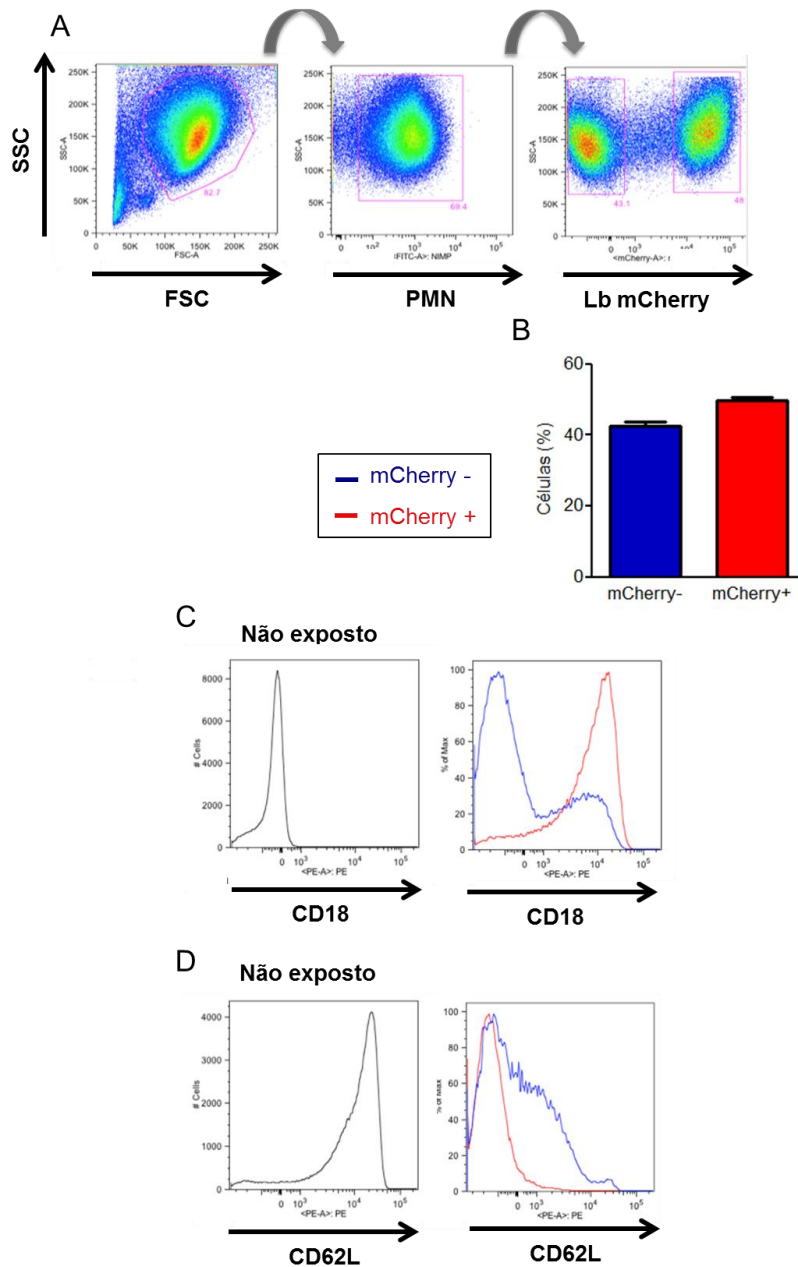


Figura 15: Neutrófilos da medula óssea infectados com *L. braziliensis* mCherry expressam CD18 e CD62L. Neutrófilos obtidos da medula óssea foram enriquecidos por separação magnética e infectados com *L. braziliensis* mCherry opsonizada. Após duas horas, os neutrófilos foram marcados com anticorpos anti-CD18 e anti-CD62L e analisados por citometria de fluxo. (A) Estratégia de seleção de neutrófilos por tamanho, granulosidade e expressão de NIMP. (B) Identificação das populações de neutrófilos: não infectada (*bystander*/mCherry-) e infectada (mCherry+). Expressão de (C) CD18 e de (D) CD62L em neutrófilos não expostos, expostos, mas não infectados (*bystander*/mCherry-) e infectados (mCherry+). Os dados mostrados são de um experimento representativo de dois experimentos. Dado mostrado como média \pm SEM.

5.8 Produção de superóxido por neutrófilos da medula óssea expostos a *L. braziliensis*

A produção de superóxido pelos neutrófilos obtidos da medula óssea também foi avaliada por citometria de fluxo. Os neutrófilos incubados na presença de *L. braziliensis* apresentaram um aumento significativo na produção de superóxido, comparado com neutrófilos mantidos na ausência de parasitas (Figura 16A e C). Neutrófilos tratados com PMA apresentaram uma média de intensidade de fluorescência ainda maior quando comparados aos neutrófilos controle (Figura 16B e C). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos com neutrófilos elicitados por tioglicolato (Figura 8).

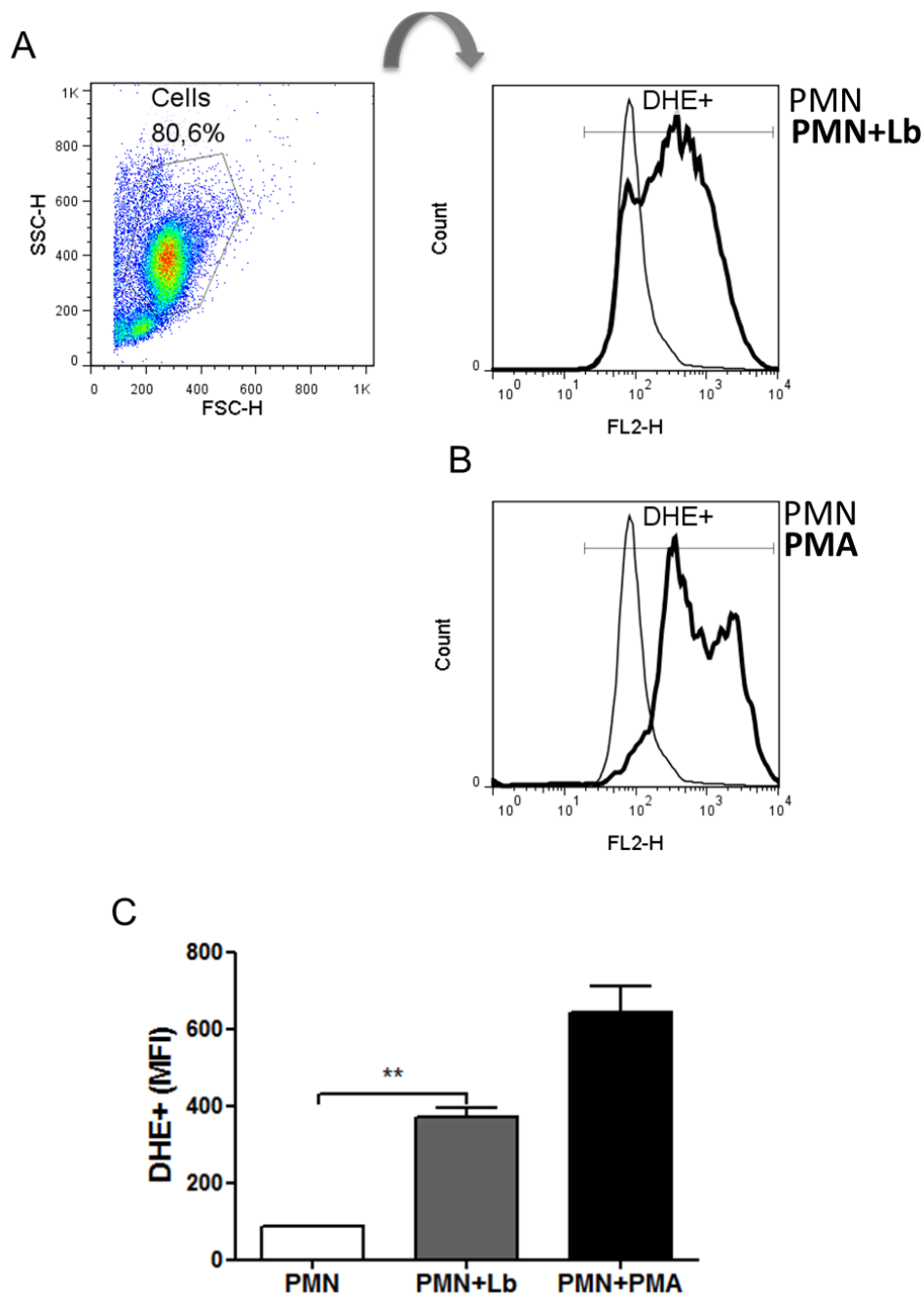


Figura 16: Neutr3filos da medula 3ssea expostos a *L. braziliensis* produzem super3oxido. Neutr3filos obtidos da medula 3ssea foram enriquecidos por separa33o magn3tica e infectados com *L. braziliensis* opsonizada. Ap3s duas horas, a produ33o super3oxido foi avaliada por citometria de fluxo. (A) Sele33o dos neutr3filos por tamanho e granuloseidade e express3o de ROS por c3lulas expostas (PMN+Lb) e por c3lulas controle (PMN). (B) Express3o de ROS por c3lulas estimuladas com PMA e por c3lulas controle (PMN). (C) Representa33o gr3fica das m3dias de intensidade de fluoresc3ncia, compiladas de tr3s experimentos diferentes, cada experimento em triplicata. Dado mostrado como m3dia \pm SEM. ** $p < 0.01$.

Posteriormente, neutrófilos da medula óssea foram infectados com *L. braziliensis* mCherry e, após avaliação por citometria de fluxo, a produção de superóxido é significativamente maior nessa população (mCherry+), quando comparada à população não infectada (*bystander*/mCherry-) (Figura 17).

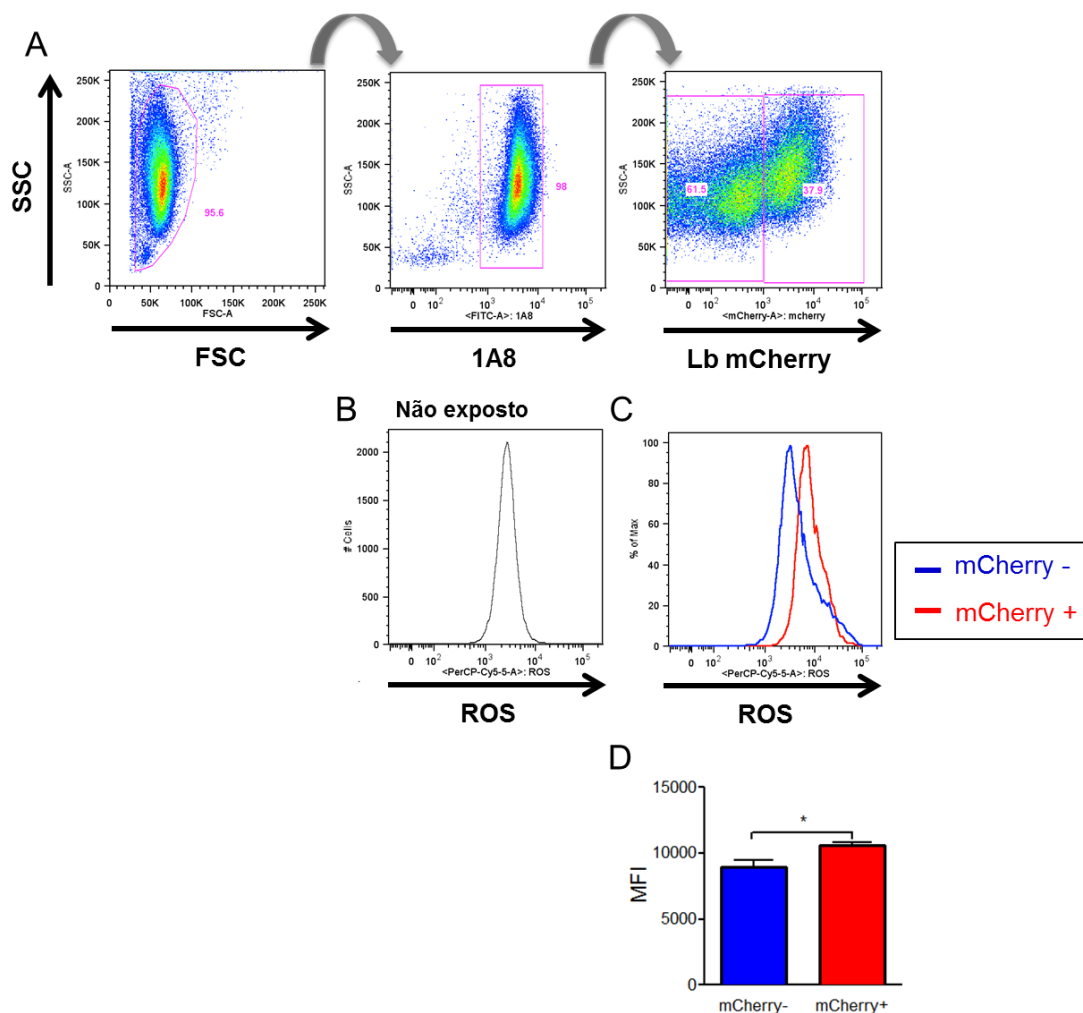


Figura 17: Neutrófilos da medula óssea infectados com *L. braziliensis* produzem superóxido. Neutrófilos obtidos da medula óssea foram enriquecidos por separação magnética e infectados com *L. braziliensis* mCherry opsonizada. Após duas horas, a produção de superóxido foi avaliada por citometria de fluxo. (A) Seleção dos neutrófilos por tamanho e granulosidade, expressão de 1A8 e identificação das populações de neutrófilos: não infectada (*bystander*/mCherry-) e infectada (mCherry+). (B) Produção de ROS por neutrófilos não expostos (controle negativo); (C) expostos, mas não infectados (*bystander*/mCherry-) e infectados (mCherry+). (D) Representação gráfica das médias de intensidade de fluorescência. Os dados mostrados são de um experimento em triplicata representativo de dois experimentos. Dado mostrado como média \pm SEM. * $p < 0.05$.

5.9 Produção de elastase neutrofílica e de TNF-a por neutrófilos da medula óssea expostos a *L. braziliensis*

Posteriormente, avaliamos a produção de elastase neutrofílica no sobrenadante da cultura de neutrófilos da medula óssea expostos a *L. braziliensis*. Como mostrado na figura 18 e corroborando os achados anteriores (Figura 9), a presença de *L. braziliensis* aumentou significativamente a liberação de elastase neutrofílica, após quatro horas de exposição.

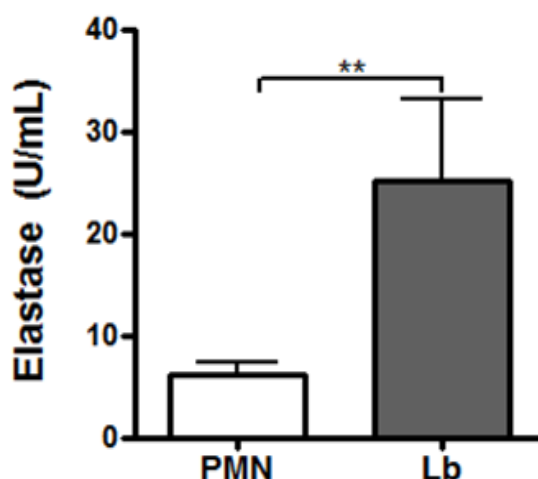


Figura 18: Neutrófilos da medula óssea expostos a *L. braziliensis* secretam elastase neutrofílica. Neutrófilos obtidos da medula óssea foram enriquecidos por separação magnética e infectados com de *L. braziliensis* opsonizadas. Após quatro horas, a produção de elastase foi avaliada por ensaio colorimétrico. Os dados mostrados são de um experimento em triplicata representativo de dois experimentos. Dado mostrado como média \pm SEM. ** $p < 0.01$.

Avaliamos também a produção de TNF-a e após duas horas de exposição, a produção de TNF-a em neutrófilos expostos aumentou (Figura 19A) e esse efeito foi significativo após 24 horas (Figura 19B), quando comparado com neutrófilos incubados na ausência de parasitas. Não foi possível detectar IL-10 com duas horas de cultura e, após 24h, o nível de IL-10 na cultura com *L. braziliensis* foi inferior a 5pg/ml (dados não mostrados).

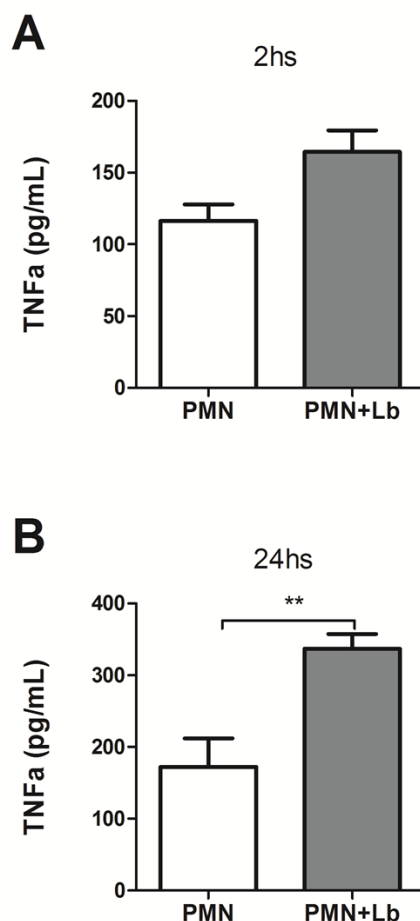


Figura 19: Neutr3filos da medula 3ssea expostos a *L. braziliensis* produzem n3veis mais elevados de TNF-a. Neutr3filos obtidos da medula 3ssea foram enriquecidos por separa33o magn3tica e infectados *L. braziliensis* opsonizadas. Ap3s 2 horas e 24 horas de cultivo, a produ33o de TNF-a (A e B, respectivamente) foi avaliada por (A) CBA e (B) por ELISA. Os dados mostrados s3o de um experimento representativo de dois experimentos. ** $p < 0.01$. Dado mostrado como m3dia \pm SEM.

5.10 Apoptose de neutr3filos infectados com *L. braziliensis* e neutr3filos *bystander*

No intuito de saber se a *L. braziliensis* induz ou retarda a apoptose dos neutr3filos, as c3lulas foram infectadas por 18 horas, conforme resultados publicados anteriormente (Aga *et al.*, 2002). Inicialmente, analisamos a morfologia dos neutr3filos por microscopia eletr3nica (esses experimentos foram realizados

com neutrófilos obtidos após a estimulação com tioglicolato). Na figura 20A, observamos um neutrófilo viável não infectado, com aspecto íntegro e núcleo sem condensamento da cromatina. Na figura 20B, observamos os neutrófilos tratados com *etoposide*, um indutor de apoptose, como controle positivo. Após 18h na presença da *L. braziliensis*, o neutrófilo apresentou sinais iniciais de apoptose como presença da cromatina do núcleo condensada, mas ainda apresentando citoplasma com granulosidade (Figura 20C). Além disso, observamos vários parasitas internalizados com aspecto destruído com citoplasma extraído e restos de membrana plasmática. No detalhe, observamos os microtúbulos sub-peliculares, confirmando a presença do parasita (Figura 20C). Na figura 20D, observamos um neutrófilo infectado em estágio mais tardio de apoptose, com a cromatina do núcleo mais condensada e o citoplasma menos granuloso.

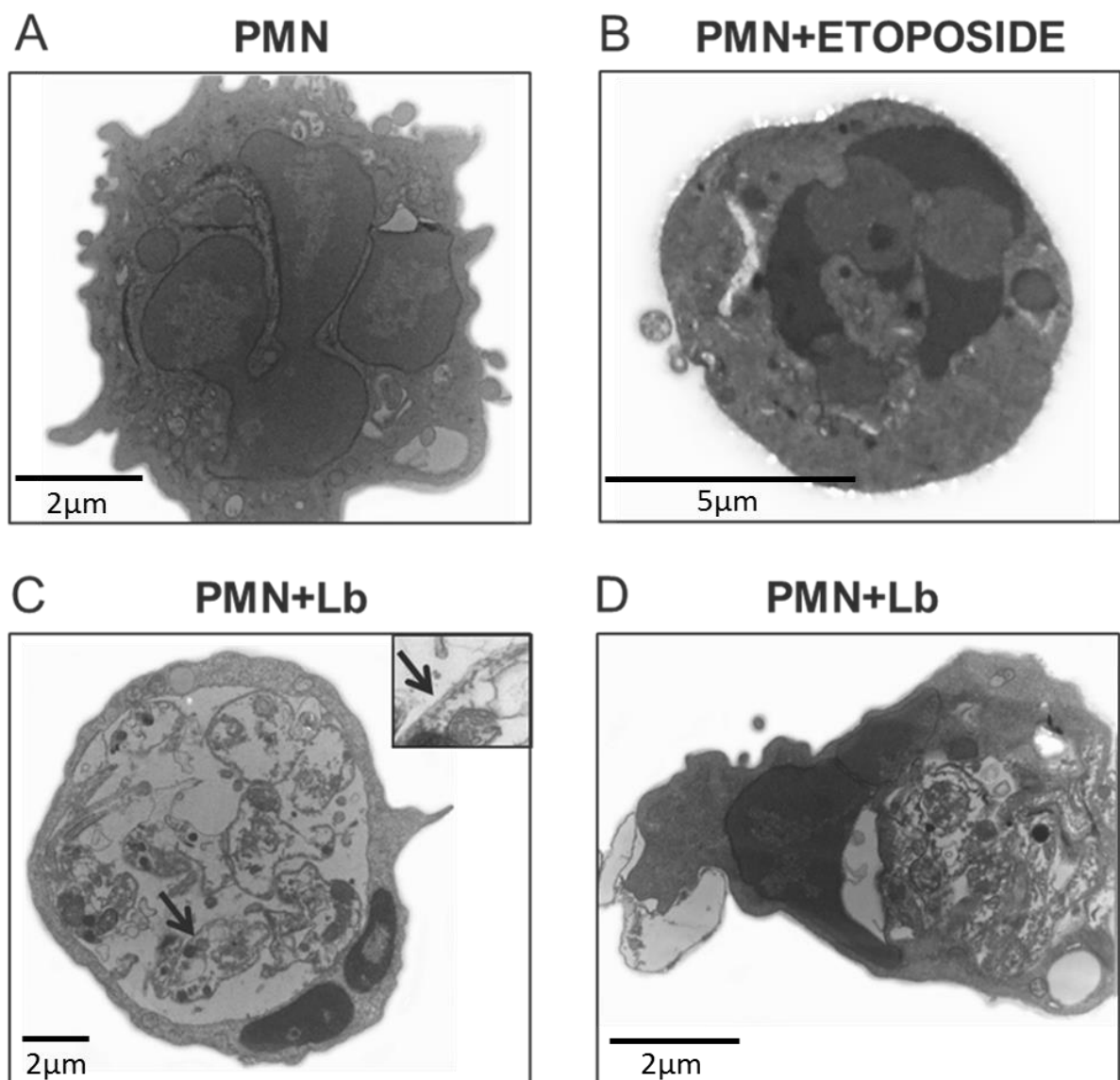


Figura 20: Morfologia de neutrófilos do peritônio expostos a *L. braziliensis*. Os neutrófilos obtidos por estimulação com tioglicolato foram expostos às promastigotas de *L. braziliensis* opsonizadas ou os neutrófilos foram tratados com etoposide como controle positivo. Após 18 horas, as células foram processadas para a microscopia eletrônica. (A) Neutrófilo viável não exposto ao parasita (aumento 8300x), (B) controle positivo (aumento 7900x), (C) neutrófilo com apoptose inicial com parasitas internalizados (aumento 5000x), em detalhe microtúbulos sub-peliculares dos parasitas e (D) neutrófilo com apoptose tardia (aumento 8000x).

Para confirmar os resultados observados por microscopia eletrônica, realizamos ensaios com os neutrófilos da medula óssea. Os mesmos foram infectados com *L. braziliensis* mCherry e foram marcados com Anexina V e DAPI. A expressão desses indicadores de apoptose foi avaliada por citometria de fluxo. Novamente, os neutrófilos foram selecionados por tamanho e granulosidade e por expressão de 1A8 (Figura 21A). Em seguida, avaliamos a marcação por DAPI e Anexina V nas células não expostas, nas células expostas aos parasitas e, como controle positivo, nas células tratadas com radiação ultra violeta (UV) (Figura 21). Neutrófilos mantidos em cultura na ausência de parasitas apresentaram baixa marcação por DAPI e Anexina V (Figura 21B). Na presença da *L. braziliensis*, ocorre um aumento na porcentagem de células positivas para Anexina V e DAPI (Figura 21B). Como esperado, quase a totalidade das células expostas à UV também é positiva para Anexina V e DAPI (Figura 21B). Esse aumento significativo na população duplo positiva (Anexina V e DAPI) (Figura 21C) confirma que o parasita é capaz de induzir apoptose nos neutrófilos.

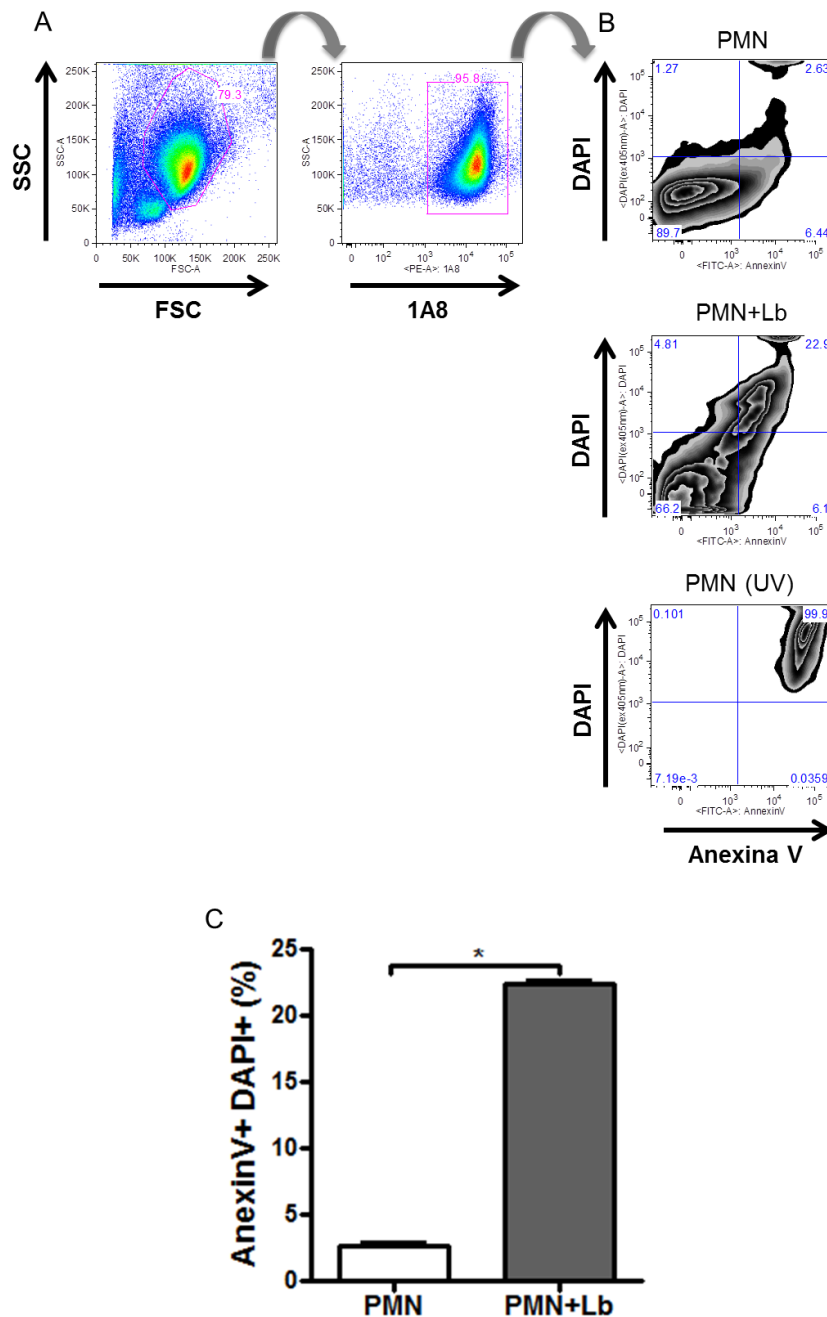


Figura 21: Quantificação da taxa de apoptose de neutrófilos expostos a *L. braziliensis*. Neutrófilos obtidos da medula óssea foram enriquecidos por separação magnética e infectados com *L. braziliensis* opsonizadas. Alternativamente, os neutrófilos foram expostos à luz UV. Após 18 horas, as células foram marcadas com Anexina V e DAPI e foram adquiridas e analisadas por citometria de fluxo. (A) Estratégia de seleção de neutrófilos por tamanho, granulosidade e expressão de 1A8. (B) A expressão de Anexina V e DAPI na população de neutrófilos controle (PMN), expostos aos parasitas (PMN+Lb) ou à radiação UV foi determinada por citometria de fluxo. (C) Porcentagem de células Anexina V+/DAPI+. Os dados mostrados são de um experimento representativo de três experimentos. *p<0.05. Dado mostrado como média ± SEM.

Com base no resultado acima, fomos investigar a apoptose em neutrófilos infectados e em neutrófilos *bystander*. Comparando a marcação de Anexina V e DAPI em neutrófilos mantidos em cultura (*bystander*/mCherry-) e em neutrófilos infectados (mCherry+), vimos que a apoptose (Anexina+/DAPI+) foi significativamente maior na população infectada (mCherry+) do que na população *bystander* (mCherry-) (Figuras 22A e B, respectivamente). Entretanto, a apoptose tardia foi um pouco maior na população *bystander* (7,43%, Figura 22A) do que na população de neutrófilos não expostos (2,63%, Figura 21B), sugerindo que a presença do parasita já é capaz de induzir a apoptose do neutrófilo, mesmo sem que haja infecção. A taxa de infecção após 18 horas de incubação com *L. braziliensis*, avaliada por citometria de fluxo, foi cerca de 30% (Figura 22C).

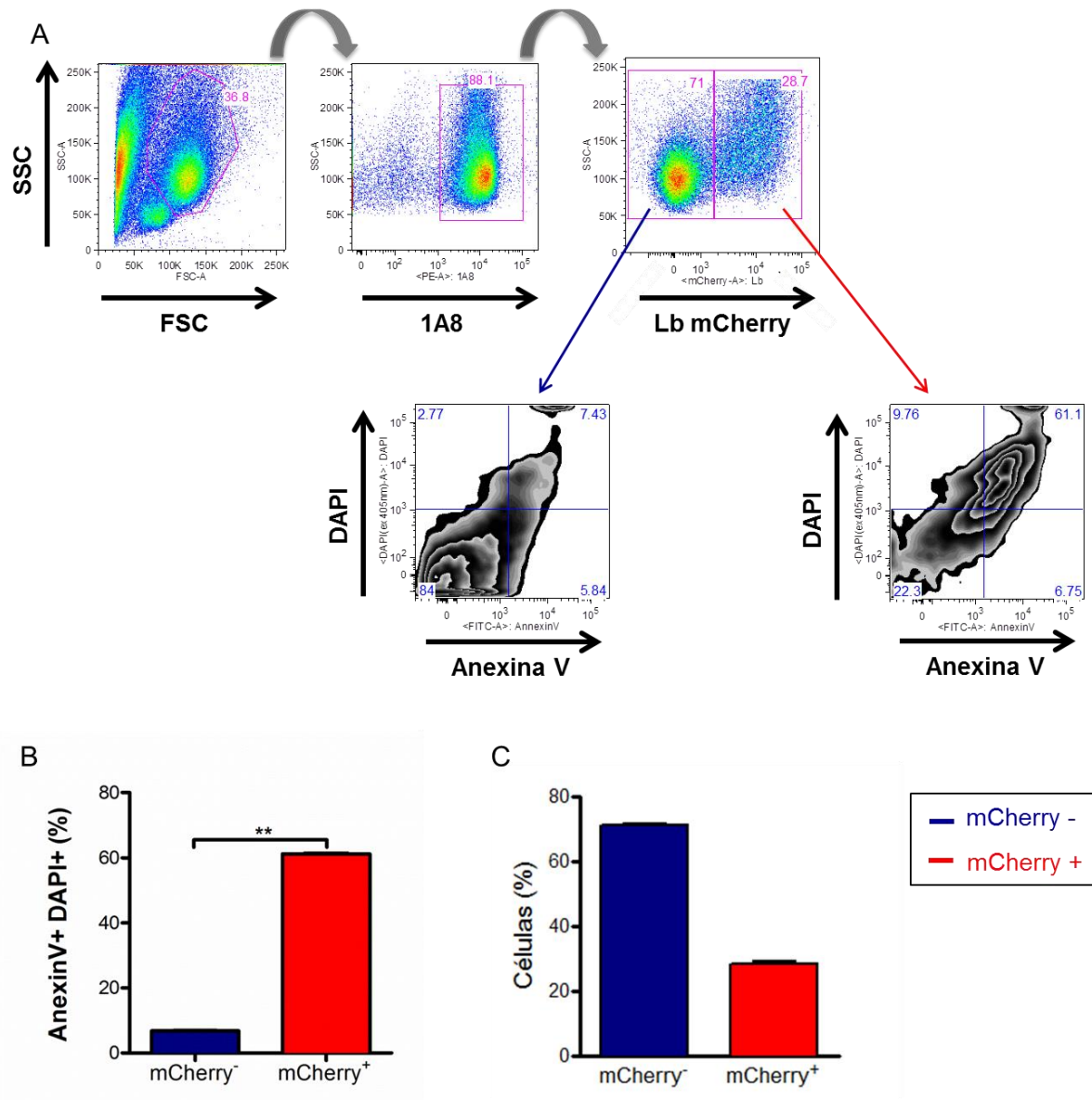


Figura 22: *L. braziliensis* induz apoptose em neutrófilos da medula óssea infectados. Neutrófilos obtidos da medula óssea foram infectados com *L. braziliensis* opsonizadas. Após 18 horas, as células foram marcadas Anexina V e DAPI e foram adquiridas por citometria de fluxo. (A) Estratégia de seleção de neutrófilos por tamanho, granulosidade e expressão de 1A8 e identificação das subpopulações de células infectadas (mCherry+) e não infectadas (mCherry-). A expressão de Anexina V e DAPI nessas subpopulações foi avaliada por citometria de fluxo. (B) Porcentagem de células com dupla expressão de Anexina V e DAPI. (C) Taxa de infecção. Os dados mostrados são de um experimento representativo de três experimentos. * $p < 0.05$. Dado mostrado como média \pm SEM.

5.11 Carga parasitária de camundongos depletados de neutrófilos e posteriormente infectados com *L. braziliensis*

Por fim, para avaliarmos o efeito da ausência dos neutrófilos na infecção por *L. braziliensis in vivo*, camundongos BALB/c foram depletados de neutrófilos com uma única dose do anticorpo monoclonal específico 1A8. Como controle, outro grupo de animais recebeu a mesma dose de isotipo controle. Após 6 horas, os animais foram infectados na orelha com *L. braziliensis*. Em diferentes tempos, as orelhas e os linfonodos drenantes foram removidos para avaliação da carga parasitária. Com sete dias de infecção, detectamos parasitas somente na orelha do grupo depletado (Figura 23A). Não observamos parasitas na orelha do grupo controle (Figura 23A), nem no linfonodo dos animais de nenhum dos grupos (Figura 23B). Após 14 dias, o número de parasitas foi significativamente maior na orelha do grupo depletado comparado ao grupo controle (Figura 23C) e, no linfonodo drenante, detectamos parasitas apenas no grupo depletado (Figura 23D).

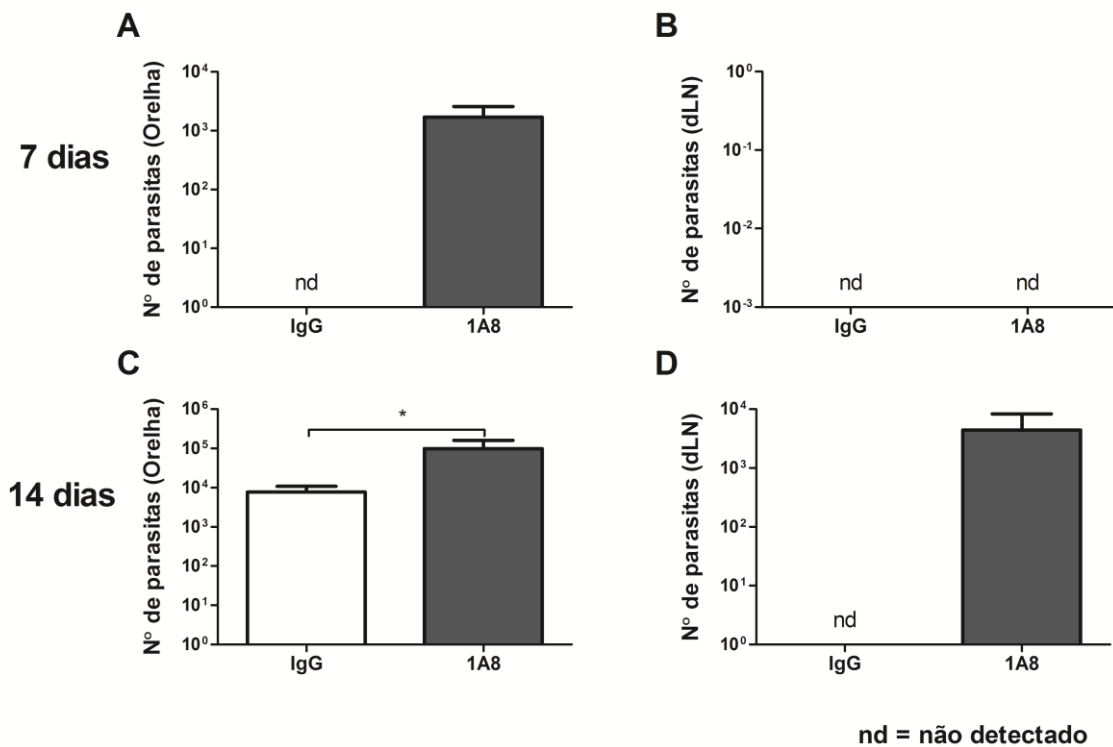


Figura 23: A depleção de neutrófilos aumenta o número de parasitas em camundongos infectados com *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c foram tratados uma vez com anticorpo 1A8 ou com o isotipo controle (IgG) e foram infectados na orelha com *L. braziliensis*. Após 7 (A e B, respectivamente) e 14 dias (C e D, respectivamente), a carga parasitária da orelha e do linfonodo drenante foi determinada pelo ensaio de diluição limitante. Os dados mostrados são de um experimento representativo de dois experimentos. * $p < 0.05$. Dado mostrado como média \pm SEM.

6 DISCUSSÃO

Na infecção por *L. braziliensis*, observamos o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (de Moura *et al.*, 2005). Esses resultados foram confirmados em um trabalho subsequente no qual mostramos que os neutrófilos cooperam com macrófagos no controle da infecção (Novais *et al.*, 2009). Diante desses achados, partimos da hipótese que os neutrófilos são importantes para o controle inicial da infecção por *L. braziliensis*. Nesse trabalho, avaliamos a interação entre essas duas células *in vitro* e o efeito da ausência de neutrófilos na carga parasitária, em modelo experimental de infecção.

A fagocitose de *L. major* por neutrófilos humanos ocorre via dois mecanismos: um dependente e outro independente de opsonina. O mecanismo dependente de opsonina leva à ativação de neutrófilos e é mais rápida. Por outro lado, a fagocitose independente de opsonina é mais lenta e os parasitas escapam da morte intracelular, pois os neutrófilos não são ativados (Laufs *et al.*, 2002). A molécula C3 do complemento é importante para o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção por *L. major* (pata de camundongo BALB/c, onde muitos neutrófilos infectados foram observados), diferente do que foi observado em camundongos deficientes em C3 (Jacobs *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, observamos que os neutrófilos elicitados por tioglicolato fagocitaram a *L. braziliensis* opsonizada com soro fresco e, após uma hora, foi possível identificar neutrófilos infectados. A porcentagem de células infectadas aumentou até quatro horas de infecção, mas sem diferenças significantes entre os tempos avaliados. Os neutrófilos da medula óssea também foram capazes de fagocitar parasitas, porém a taxa de infecção foi menor que a observada com neutrófilos elicitados. O CD11b juntamente com o CD18 formam o Mac-1 (CR3) que reconhece partículas opsonizadas e promove a fagocitose (Abbas *et al.*, 2008). Neutrófilos elicitados por tioglicolato e neutrófilos da medula óssea apresentaram aumento significativo na expressão de CD18, na presença de *L. braziliensis*. Esse aumento da expressão de CD18 pode ter sido provocada pela exocitose de grânulos secretores, contendo CR3 (revisado em Faurichou & Borregaard, 2003). Além disso, a expressão de CD11b nos neutrófilos elicitados, mesmo sem exposição a *L. braziliensis* foi maior do que a encontrada em neutrófilos da medula óssea (dado não mostrado), talvez decorrente do

recrutamento por tioglicolato. Portanto, a expressão elevada do CD11b nos neutrófilos elicitados pode ter contribuído para maior expressão de Mac-1 (CR3), permitindo uma fagocitose mais eficiente, do que à encontrada nos neutrófilos da medula óssea, como observado na taxa de infecção registrada nesses experimentos. Além dos neutrófilos elicitados serem inflamatórios, os neutrófilos da medula óssea são basais e, alguns podem não estar completamente maduros, influenciando no retardo da fagocitose.

Neutrófilos elicitados por tioglicolato apresentaram aumento discreto na expressão de CD62L enquanto que os neutrófilos da medula óssea infectados com *L. braziliensis* apresentaram diminuição na expressão de CD62L. Nesses experimentos, pudemos avaliar os neutrófilos *bystander*, que entraram em contato com o parasita, mas que não foram infectados e esses também apresentaram uma menor expressão de CD62L. A diminuição na expressão de CD62L indica ativação dos neutrófilos (Zhang *et al.*, 2009) e, assim, podemos concluir que os neutrófilos da medula óssea foram ativados pela presença do parasita. Essa diminuição da expressão de CD62L também foi mostrada em neutrófilos humanos infectados com *L. major*, na presença de soro fresco (Laufs *et al.*, 2002). Por outro lado, a maior expressão de CD62L observada em neutrófilos elicitados indica que o tioglicolato pode interferir no efeito provocado pela presença da *L. braziliensis*.

Neutrófilos apresentam como um dos mecanismos microbicidas a liberação de ROS. Porém a interação da *L. major* com neutrófilos humanos não induziu a produção de ROS que pode ter sido provocado pela inibição da fusão de grânulos terciários ou específicos (Mollinedo *et al.*, 2010). Anteriormente foi demonstrado que a co-cultura de neutrófilos murinos vivos e macrófagos infectados com *L. braziliensis* induziu a morte do parasita com concomitante produção de superóxido (Novais *et al.*, 2009). No presente estudo, corroboramos esses dados pois encontramos um aumento da produção de ROS por neutrófilos infectados com *L. braziliensis*, sugerindo uma resposta microbicida à presença do parasita. Além de ROS, detectamos a liberação de elastase neutrofílica (aproximadamente 20U/mL) após incubação de neutrófilos com *L. braziliensis*. O mesmo efeito foi visto em neutrófilos de camundongos BALB/c infectados com *L. major* (aproximadamente 20mU/mL) (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007). A atividade da elastase encontrada aqui, após a infecção de neutrófilos de BALB/c por *L. braziliensis* foi, portanto, muito maior quando comparada à produção induzida pela *L. major*. O estresse oxidativo mostrou

ser importante juntamente com a elastase para o controle da infecção por *L. major* em macrófagos (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007). Na presença de *L. braziliensis* vimos secreção de NE e produção de superóxido, que podem, portanto, atuar juntos no controle da infecção. Além disso, a morte da *L. major* provocada pela NE em camundongos C57BL/6 foi dependente de TLR4 e de TNF-a secretado pelos macrófagos: NE e TNF-a foram necessários para a morte do parasita juntamente com o NE (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007). Em um outro trabalho, foi observado que o inibidor de serina peptidase 2 (ISP2), presente na *L. major*, modula o desenvolvimento intracelular da *L. major*, permitindo a sobrevivência do parasita no macrófago (Faria *et al.*, 2011). A *L. major* foi capaz de prevenir a ativação da resposta mediada pelo TLR4 que, por sua vez, inibiu a secreção de NE. Neutrófilos foram observados concentrados principalmente no epitélio e na lâmina própria, na borda da úlcera ou nas áreas necróticas, em biópsias de pacientes com ML. Além disso, neutrófilos exibiram intensa imuno-marcação para elastase neutrofílica (Boaventura *et al.*, 2010).

A presença de *L. braziliensis* na cultura com neutrófilos elicitados por tioglicolato diminuiu a produção de TNF-a em relação às células controle. Entretanto, com neutrófilos da medula, observamos um aumento na produção de TNF-a após a cultura com *L. braziliensis*. Neutrófilos humanos, infectados com *L. major in vitro* por 18 horas, apresentaram um pequeno aumento da secreção de TNF-a quando comparado com neutrófilos não expostos ao parasita. No entanto, neutrófilos de pacientes curados da LC e estimulados com *L. major* apresentaram um aumento de TNF-a e esse aumento foi ainda maior em neutrófilos de pacientes assintomáticos (Safaiyan *et al.*, 2011), sugerindo que o TNF-a é importante para a cura da doença e para que não ocorra o desenvolvimento dos sintomas clínicos em alguns pacientes. A forma solúvel de TNF-a resulta da clivagem do TNF de membrana (mTNF) e experimentos mostraram que camundongos deficientes em TNF solúvel têm um acúmulo maior de neutrófilo nas lesões quando comparado ao camundongo deficiente em mTNF (Allenbach *et al.*, 2008). A presença do mTNF, na ausência de TNF solúvel, foi suficiente para controlar a lesão inflamatória causada pela *L. major*, em parte pela regulação do número de neutrófilos no sítio de inoculação. Esse resultado sugere que mTNF é importante para o recrutamento de neutrófilos para o sítio da lesão e, por sua vez, neutrófilos são importantes no controle da lesão provocada pela *L. major*. No presente trabalho, observamos a secreção de TNF-a

pelos neutrófilos expostos a *L. braziliensis*, indicando que talvez o número de neutrófilos na lesão seja moderado nesse modelo. Ainda, neutrófilos murinos vivos, co-cultivados com macrófagos, induziram a morte de *L. braziliensis* no macrófago infectado e esse efeito também foi associado com a presença de TNF-a pois quando o TNF-a foi bloqueado, a taxa de infecção dos macrófagos foi maior (Novais *et al.*, 2009). Pacientes com LC de área endêmica para *L. braziliensis* foram avaliados e os achados sugeriram que o tamanho da lesão está relacionado com o tempo de cura e os níveis de TNF-a, que quanto mais elevados estiverem, maior a lesão (Oliveira *et al.*, 2011). Portanto, TNF-a pode contribuir para o controle da lesão, mas em grandes quantidades pode exacerbar a lesão. Em um outro estudo, a produção de TNF-a de pacientes com LC foi observada antes e 60 dias após o início do tratamento (Junior *et al.*, 2002). Em ambos os grupos de pacientes, os níveis iniciais foram semelhantes antes da terapia e caíram significativamente após o tratamento.

Além do TNF-a, a expressão de IL-10 foi encontrada em neutrófilos de camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*, mas não em camundongos BALB/c (Charmoy *et al.*, 2007). Em contrapartida, *L. major* promoveu a liberação de TGF- β em neutrófilos de BALB/c, o que foi associado com a inibição da resposta Th1. Na infecção por *L. donovani*, camundongos BALB/c depletados de neutrófilos apresentaram aumento na expressão de IL-10, o que provocou um aumento da carga parasitária (McFarlane *et al.*, 2008). Em nossos experimentos, observamos que a presença da *L. braziliensis* induziu secreção de TNF-a, mas não de IL-10 (níveis inferiores a 5pg/mL, dado não mostrado). Diante desses resultados, podemos sugerir que a presença de TNF-a, na ausência de IL-10, promove o controle da infecção.

Avaliamos também a produção de quimiocinas em neutrófilos expostos à *L. braziliensis*. Nas culturas de neutrófilos elicitados por tioglicolato, observamos a presença de CCL3 (MIP1-a) e CCL4 (MIP1-b), após contato com a *L. braziliensis*. Já no modelo de infecção por *L. major*, neutrófilos de camundongos C57BL/6 expressaram CCL3 e essa expressão foi menor em camundongos depletados de neutrófilos. Além disso, a migração de células dendríticas em camundongos deficientes em CCL3 também foi menor, indicando que os neutrófilos influenciam esse processo. Entretanto, no camundongo BALB/c infectado com *L. major*, não houve aumento do recrutamento de células dendríticas nem a liberação de CCL3, CCL4 ou CCL5 (Charmoy *et al.*, 2010). Aqui, observamos que o sobrenadante de

neutrófilos infectados com *L. braziliensis* induziu a quimiotaxia de células dendríticas, provavelmente devido à presença de CCL3 e de CCL4. Esse dado sugere que os neutrófilos podem exercer um papel na iniciação da resposta imune adaptativa a *L. braziliensis*. Neutrófilos de C57BL/6 infectados com *T. gondii* também induziram a quimiotaxia de células dendríticas, na qual quimiocinas como CCL3, CCL4, CCL5 e CCL20 estavam envolvidas e a depleção dessas quimiocinas reduziu o índice quimiotático de células dendríticas (Bennouna *et al.*, 2003). Megiovanni *et al.* (2006) mostraram que o bloqueio de CD18 em neutrófilos inibiu a expressão de HLA-DR e de CD86 em células dendríticas co-cultivadas, indicando que o complexo formado por CD11b e CD18 é importante para a ativação de células dendríticas. Outros trabalhos mostraram que neutrófilos humanos interagem com os macrófagos infectados com *L. major* via CD28-CD80/CD86, resultando na produção de IFN-g pelos neutrófilos (Venuprasad *et al.*, 2002). Ademais, neutrófilos estimulados com anti-CD28 e co-cultivados com macrófagos secretaram IFN-g, resultando na diminuição no número de parasitas dentro dos macrófagos e no aumento da secreção de IFN-g pelas células T CD4+ (Venuprasad *et al.*, 2003). Aqui, também observamos aumento na expressão de CD18 em neutrófilos infectados com *L. braziliensis*, mas não investigamos a produção de IFN-g pelos mesmos. No entanto, podemos especular que os neutrófilos expostos à *L. braziliensis* podem exercer papel importante na ativação de células dendríticas e, por sua vez, na indução do desenvolvimento de uma resposta mista Th1/Th2. Vale lembrar que o modelo experimental de infecção de camundongos BALB/c com *L. braziliensis* é um modelo de cura espontânea (de Moura *et al.*, 2005), com o desenvolvimento de uma resposta imune mista.

Neutrófilos elicitados por tioglicolato e infectados com *L. braziliensis* por 18 horas apresentaram um aspecto apoptótico, identificado pela cromatina condensada do núcleo. Os experimentos realizados com neutrófilos da medula óssea também mostraram um aumento na expressão de anexina V e DAPI e, assim, sugerimos que a *L. braziliensis* induz apoptose nos neutrófilos. Além disso, a população *bystander* (exposta ao parasita, mas não infectada) apresentou uma expressão maior de anexina V/DAPI+ que os neutrófilos não expostos, sugerindo que a presença de *L. braziliensis* é capaz de induzir a apoptose mesmo na ausência de fagocitose do parasita. Contudo, neutrófilos humanos infectados com *L. major* por 18 horas não apresentaram aspecto apoptótico, indicando que a *L. major* inibe a apoptose

espontânea do neutrófilo (Aga *et al.*, 2002). A apoptose de neutrófilos de humanos infectados com *L. major* foi observada apenas após 42 horas de infecção e antes disso detectou-se a liberação de CCL4 e o recrutamento de monócitos. Esses dados sugerem que a *L. major* desenvolveu um mecanismo de escape, no qual o parasita retarda a apoptose do neutrófilo, permitindo o recrutamento dos monócitos e, então, a internalização dos parasitas pelos macrófagos, pela fagocitose de neutrófilos apoptóticos, entrando assim, na célula hospedeira obrigatória de forma silenciosa (Van Zandbergen *et al.*, 2004), sendo essa a hipótese do Cavalo de Tróia. Entretanto, a *L. braziliensis*, parece não ter desenvolvido essa estratégia, nem exercer esse efeito: por microscopia eletrônica, observamos os parasitas com aspecto destruído, com microtúbulos desarranjados, diferente do aspecto íntegro relatado para *L. major* no interior do neutrófilo humano (Van Zandbergen *et al.*, 2004). Células dendríticas da derme de camundongos C57BL/6 que capturaram neutrófilos apoptóticos apresentaram atraso na sua ativação e, conseqüentemente, na ativação dos linfócitos, retardando o início da resposta imune adaptativa em resposta à infecção por *L. major* (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012). Assim, a *L. major* parece explorar o mecanismo de eferocitose para se estabelecer no hospedeiro. Na estratégia do Coelho de Tróia, os parasitas escapam dos neutrófilos antes de infectar os macrófagos. Em paralelo, os neutrófilos apoptóticos são fagocitados e silenciam os macrófagos, permitindo, assim, a infecção do macrófago desativado pelo parasita que escapou (revisado em Ritter *et al.*, 2009).

Outra estratégia utilizada na infecção por *L. donovani*, baseia-se no fato que os parasitas promovem a formação de um compartimento não lítico nos neutrófilos, o qual não se funde com o lisossomo. Assim, a *L. donovani* sobrevive no interior do neutrófilo e o LPG é requerido para a manutenção do parasita nesses compartimentos. Essa estratégia também pode contribuir para a transferência dos parasitas para macrófagos (Gueirard *et al.*, 2008). Na infecção natural, componentes da saliva do flebótomo podem contribuir para indução da apoptose: um componente protéico da saliva de *Lutzomyia longipalpis* induziu o aumento da apoptose do neutrófilo, via FasL e dependente de Caspase (Prates *et al.*, 2011). Nesse trabalho, a apoptose do neutrófilo aumentou a viabilidade da *L. chagasi*. Na infecção por *L. major*, a apoptose de neutrófilos foi acelerada via FasL e a fagocitose de neutrófilos pelos macrófagos também foi acelerada, aumentando o número de parasitas no macrófago (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2005). A expressão de FasL e TRAIL na pele foi

investigada em manifestações ulceradas ou não ulceradas de LC induzida por *L. aethiopica*. Uma maior expressão de FasL e TRAIL foi detectada em lesões ulceradas. A neutralização do FasL e TRAIL *in vivo*, em BALB/c, reduziu a ulceração e não foi associada com o aumento de carga parasitária ou com a disseminação da infecção para os órgãos linfáticos (Tasew *et al.*, 2010). Esses dados sugerem que estratégias por parte do parasita para sobreviver no interior de neutrófilos bem como a indução da apoptose de neutrófilos levando à fagocitose do parasita pelos macrófagos, são importantes para a sobrevivência do parasita no hospedeiro. Na infecção por *L. braziliensis*, vimos que esta não retarda a apoptose do neutrófilo, sendo observada alta presença de neutrófilos apoptóticos. Entretanto, o parasita não parece viável dentro do neutrófilo, conforme demonstrado pela microscopia eletrônica. Portanto, a *L. braziliensis* não adquiriu a estratégia observada na *L. major* de retardar a apoptose do neutrófilo.

Na literatura já foram demonstrados os efeitos da depleção dos neutrófilos no curso da infecção por diversas espécies de *Leishmania*, em linhagens diferentes de camundongo. A depleção de neutrófilos com anticorpo RB6-BC5, em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, aumentou do tamanho da lesão na pata (Chen *et al.*, 2005). O mesmo foi observado no camundongo C57BL/6. Entretanto, o anticorpo RB6-8C5 também depleta eosinófilos (Lima *et al.*, 1998). Mais tarde, a depleção com anticorpo NIMP-R14, específico para neutrófilo, resultou em lesões menores em camundongo BALB/c infectado com *L. major* (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000), sugerindo que os neutrófilos desempenham um papel deletério na infecção de BALB/c por *L. major*. Por outro lado, a depleção de neutrófilos, com NIMP-R14, em camundongo BALB/c infectado com *L. donovani* gerou um aumento na carga parasitária no baço e medula óssea (McFarlane *et al.*, 2008). Resultado semelhante foi observado na infecção de camundongos BALB/c com *L. braziliensis* (Novais *et al.*, 2009). Nesse trabalho, a depleção de neutrófilos (feita com RB6-BC5 por meio de administrações a cada 3 dias) levou ao aumento da lesão e da carga parasitária, na orelha e no linfonodo após 2 semanas de infecção (Novais *et al.*, 2009). Aqui, repetimos o ensaio empregando uma injeção única do anticorpo monoclonal 1A8, específico para neutrófilos, 6 horas antes da inoculação de parasitas. Houve aumento da carga parasitária na orelha e, no linfonodo, os parasitas foram detectados apenas no grupo depletado. Esses resultados corroboram os resultados anteriores e mostram que os neutrófilos exercem papel importante no controle da

infecção por *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, no período inicial da resposta imune.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os nossos resultados, a *L. braziliensis* ativa os neutrófilos, aumentando a expressão de CD18, em ambos tipos de neutrófilos e, diminuindo a expressão de CD62L, apenas em neutrófilos da medula óssea. Essa ativação leva a produção de superóxido, secreção de elastase e liberação de TNF- α que contribuem para a morte do parasita, este último em neutrófilos da medula somente. A *L. braziliensis* não impede que neutrófilos entrem em apoptose, e assim, neutrófilos e parasitas internalizados são destruídos. Essa importância dos neutrófilos na morte dos parasitas é evidenciada pelo aumento de parasitas nos animais depletados de neutrófilos. Em paralelo, neutrófilos secretam quimiocinas que induzem o recrutamento de células dendríticas, para que seja iniciada a resposta adaptativa. Neutrófilos, portanto, são importantes no combate ao parasita no período inicial da infecção por *L. braziliensis* e em gerar sinais que são capazes de dar início à resposta imune adaptativa.

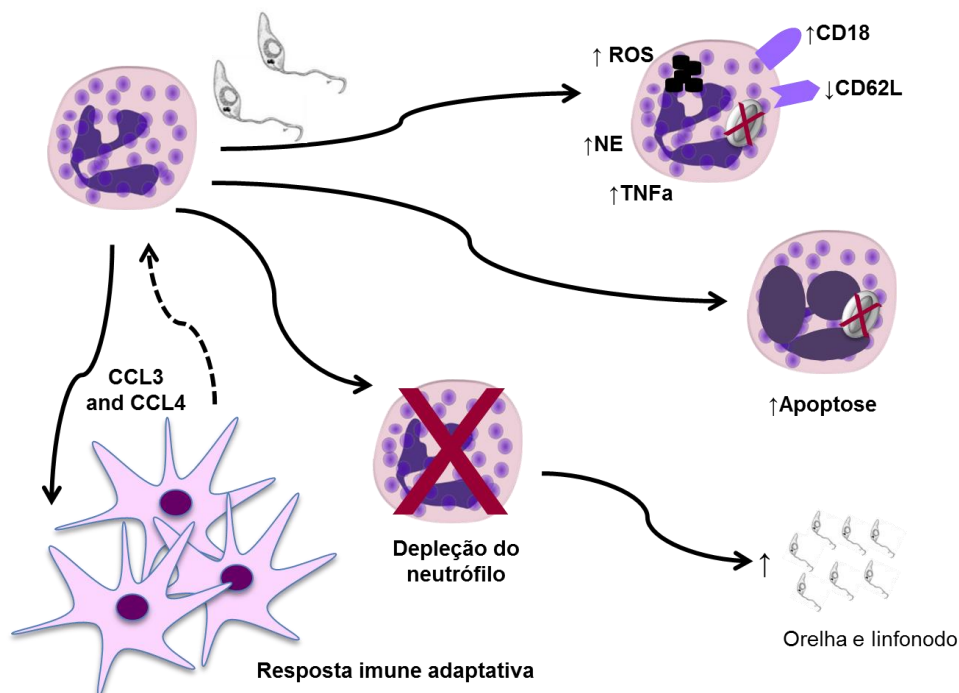


Figura 24: Modelo final proposto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. (2008). *Imunologia celular e molecular*. Elsevier.
- Abi Abdallah, D. S., & Denkers, E. Y. (2012). Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Frontiers in immunology*, 3(December), 382.
- Afonso, L., Borges, V. M., Cruz, H., Ribeiro-Gomes, F. L., DosReis, G. a, Dutra, A. N., Clarêncio, J., et al. (2008). Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *Journal of leukocyte biology*, 84(2), 389–96.
- Aga, E., Katschinski, D. M., Van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Müller, K., Solbach, W., et al. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of immunology*, 169(2), 898–905.
- Allenbach, C., Zufferey, C., Perez, C., Mueller, C., Tacchini-cottier, F., & Launois, P. (2011). TNF , a Process Amplified by *Leishmania major* 1. *Journal Immunology*. 176, 6656-6664.
- Allenbach, C., Launois, P., Mueller, C., & Tacchini-Cottier, F. (2008). An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. *European journal of immunology*, 38(3), 720–31.
- Allenbach, C., Zufferey, C., Perez, C., Launois, P., Mueller, C., Tacchini-cottier, F. (2006). Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by *Leishmania major*. *Journal immunology*, 176, 6656-6664.
- Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J., & Denkers, E. Y. (2003). Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *Journal of immunology*, 171(11), 6052–6058.
- Bittencourt, A. L.; Barral-Netto, M. (1995). "Leishmaniasis" in "Tropical Patology". *Springer Verlag*, 8(2), 597-644.
- Blomgran, R., Desvignes, L., Briken, V., & Ernst, J. D. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell host & microbe*, 11(1), 81–90.
- Boaventura, V. S., Santos, C. S., Cardoso, C. R., De Andrade, J., Dos Santos, W. L. C., Clarêncio, J., Silva, J. S., et al. (2010). Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *European journal of immunology*, 40(10), 2830–6.
- Bomfim, G., Andrade, B. B., Santos, S., Clarêncio, J., Barral-Netto, M., & Barral, A. (2007). Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights

into the early phases of human disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(5), 854–9.

Boudaly, S. (2009). Activation of dendritic cell by polymorphonuclear neutrophils. *Frontiers in Bioscience*, 14, 1589–1595.

Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *The Journal of cell biology*, 198(5), 773–83.

Castilho, T. M., Shaw, J. J., & Floeter-winter, L. M. (2003). New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of Leishmania Species, 41(2), 540–546.

Bennouna, S., & Denkers, E. Y. (2005). Microbial Antigen Triggers Rapid Mobilization of TNF- α to the Surface of Mouse Neutrophils Transforming Them into. *Journal Immunology*, 174, 4845-4851.

Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A. E. I., et al. (2010). Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice. *PLoS pathogens*, 6(2), 1-12.

Charmoy, M., Megnekou, R., Allenbach, C., Zweifel, C., Perez, C., Monnat, K., Breton, M., et al. (2007). *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *Journal of leukocyte biology*, 82(2), 288–99.

Chen, L., Zhang, Z.-H., Watanabe, T., Yamashita, T., Kobayakawa, T., Kaneko, A., Fujiwara, H., et al. (2005). The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitology international*, 54(2), 109–18.

De Souza Carmo, E. V., Katz, S., & Barbiéri, C. L. (2010). Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PloS one*, 5(11), 1-8.

Faria, M. S., Reis, F. C. G., Azevedo-Pereira, R. L., Morrison, L. S., Mottram, J. C., & Lima, A. P. C. a. (2011). Leishmania inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. *Journal of immunology*, 186(1), 411–22.

Faurschou, M. & Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection*, 5, 1317-1327.

Filardy, A. A., Pires, D. R., Nunes, M. P., Takiya, C. M., Freire-de-Lima, C. G., Ribeiro-Gomes, F. L., & DosReis, G. a. (2010). Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *Journal of immunology*, 185(4), 2044–50.

- Gabriel, C., McMaster, W. R., Girard, D., & Descoteaux, A. (2010). *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *Journal of immunology*, 185(7), 4319–27.
- Goncalves, R., Zhang, X., Cohen, H., Debrabant, A., & Mosser, D. M. (2011). Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *The Journal of experimental medicine*, 208(6), 1253–65.
- Grimaldi, G., & Tesh, R. B. (1993). Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research, 6(3).
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G., & Desjardins, M. (2008). Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cellular microbiology*, 10(1), 100–11.
- Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., Froment, G. S., Soares, R. P. P., Morgado, F. N., Conceição-Silva, F., & Saraiva, E. M. (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(16), 6748–53.
- Hondowicz, B. & Scott, P. (2002). Influence of Parasite Load on the Ability of Type 1 T Cells To Control *Leishmania major* Infection. 70(2), 498–503.
- Jacobs, T. Andrä, J., Gaworski, I., Graefe, S., Mallenthin, K., Krömer, M., Halter, R., Borlal, J., Clos, J. (2005). Complement C3 is required for the progression of cutaneous lesions and neutrophil attraction in *Leishmania major* infection. *Med Microbiol Immunol*. 194, 143-149.
- Junior, A. D. O., Machado, P., Bacellar, O., & Cheng, L. H. (2002). Evaluation of IFN- γ and TNF- α as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis IFN- γ e TNF- α como marcadores da resposta clínica na leishmaniose cutânea, 35(1), 7–10.
- Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2009). Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. (December), 309–333.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V, et al. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*, 16(1), 3–11.
- Laufs, H., Müller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., Solbach, W., et al. (2002). Intracellular Survival of *Leishmania major* in Neutrophil Granulocytes after Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. 70(2), 826–835.

- Laskay, T., Zandbergen, G. V. & Solbach, W. (2007). Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*, 213, 183-191.
- Lima, G. M., Vallochi, a L., Silva, U. R., Bevilacqua, E. M., Kiffer, M. M., & Abrahamsohn, I. a. (1998). The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunology letters*, 64(2-3), 145–51.
- Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223:77-92.
- McFarlane, E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K. C., Alexander, J., & Tacchini-Cottier, F. (2008). Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infection and immunity*, 76(2), 532–41.
- Megiovanni, A. M., Gluckman, J. C., Boudaly, S., & Candida, D. (2006). Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes and mutually influence the two leukocyte populations occurring upstream of the interactions between, 79(May).
- Ministério da Saúde. Manual da vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. (2008) (Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_Ita_2ed.pdf; Acesso em 05/01/2008).
- Mollinedo, F., Janssen, H., De la Iglesia-Vicente, J., Villa-Pulgarin, J. a, & Calafat, J. (2010). Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry*, 285(45), 34528–36.
- Moura, T. R. De, Novais, F. O., Oliveira, F., Clare, J., Barral, A., Brodskyn, C., & Oliveira, C. I. De. (2005). Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*, 73(9), 5827–5834.
- Narni-Mancinelli, E., Campisi, L., Bassand, D., Cazareth, J., Gounon, P., Glaichenhaus, N., & Lauvau, G. (2007). Memory CD8+ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI+ phagocytes. *The Journal of experimental medicine*, 204(9), 2075–87.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews. Immunology*, 6(3), 173–82.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). (2012). (Disponível em: <http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/Pages/lifecycle.aspx>; acesso em 09/12/2012).

- Novais, F. O., Santiago, R. C., Báfica, A., Khouri, R., Afonso, L., Borges, V. M., Brodskyn, C., et al. (2009). Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *Journal of immunology*, 183(12), 8088–98.
- Oliveira, F., Báfica, A., Rosato, A. B., Favali, C. B. F., Costa, J. M., Cafe, V., Barral-Netto, M., et al. (2011). Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 85(1), 70–3.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). Leishmaniasis. 2008 (Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html; Acesso em 05/01/2008).
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., et al. (2009). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321(5891), 970–974.
- Pham, C. T. N. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nature reviews*, 6, 541-550.
- Poon, I. K. H., Hulett, M. D., & Parish, C. R. (2010). Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell death and differentiation*, 17(3), 381–97.
- Prates, D. B., Araújo-Santos, T., Luz, N. F., Andrade, B. B., França-Costa, J., Afonso, L., Clarêncio, J., et al. (2011). *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 90(3), 575–82.
- Reithinger, R.; Dujardin, J. C.; Louzir, H.; Pirmez, C.; Alexander, B.; Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7(9), 581-96.
- Ribeiro-Gomes, F. L., Moniz-de-Souza, M. C. A., Alexandre-Moreira, M. S., Dias, W. B., Lopes, M. F., Nunes, M. P., Lungarella, G., DosReis, G. A. (2007). Neutrophils activated macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *The journal of immunology*. 179, 3988-3994.
- Ribeiro-Gomes, F. L., Moniz-de-Souza, M. C. A., Borges, V. M., Nunes, M. P., Mantuano-Barradas, M., D'Avila, H., Bozza, P. T., et al. (2005). Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania major* infection. *The Journal of infectious diseases*, 192(6), 1127–34.
- Ribeiro-Gomes, F. L., Otero, A. C., Gomes, N. A., Moniz-De-Souza, M. C. a, Cysne-Finkelstein, L., Arnholdt, A. C., Calich, V. L., et al. (2004). Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *Journal of immunology*, 172(7), 4454–62.

- Ribeiro-Gomes, F. L., Peters, N. C., Debrabant, A., & Sacks, D. L. (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*leishmania* response. *PLoS pathogens*, 8(2).
- Ritter, U., Frischknecht, F., & Van Zandbergen, G. (2009). Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends in parasitology*, 25(11), 505–10.
- Rousseau, D., Demartino, S., Ferrua, B., François, J., Anjuère, F., Fragaki, K., Fichoux, Y. Le, et al. (2001). In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiology*.
- Safaiyan, S., Bolhassani, A., Nysten, S., Akuffo, H., Rafati, S. (2011). Contribution of human neutrophils in the development of protective immune response during in vitro *Leishmania major* infection. *Parasite Immunology*. 33, 609-620.
- Saitoh, T, Komano, J., Saitoh, Y, Misawa, T, Takahama, M., Kozaki, T, Uehata, T, Iwasaki, H, Omori, H, Yamaoka, S, Yamamoto, N, Akira, S. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 12(1),109-16.
- Sakar, A., Aga, E., Busmwyer, U., Battacharyya, A., Möller, S., Hellberg, L., Behmen, M., Solbach, W., Laskay, T. (2012). Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Med Microbial Immunol*.
- Scapini, P., C. Laudanna, C. Pinardi, P. Allavena, A. Mantovani, S. Sozzani, and M. A. Cassatella. (2001). Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol* 31:1981-1988.
- Segal, A. W. (2007). How Neutrophils Kill Microbes. *Europe PMC Funders Group*. 2(2).
- Silva, M. T. (2010). Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS letters*, 584(22), 4491–9.
- Tacchini-Cottier, F., Zweifel, C., Belkaid, Y., Mukankundiye, C., Vasei, M., Launois, P., Milon, G., et al. (2000). An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Journal of immunology*, 165(5), 2628–36.
- Tasew, G., Nylén, S., Lieke, T., Lemu, B., Meless, H., Ruffin, N., Wolday, D., et al. (2010). Systemic FasL and TRAIL neutralisation reduce leishmaniasis induced skin ulceration. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(10).
- Thalhofer, C. J., Chen, Y., Sudan, B., Love-Homan, L., & Wilson, M. E. (2011). Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infection and immunity*, 79(1), 108–17.

- Thorp, E., & Tabas, I. (2009). Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *Journal of leukocyte biology*, 86(5), 1089–95.
- Van Gisbergen, K. P. J. M., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B. H., & Van Kooyk, Y. (2005). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *The Journal of experimental medicine*, 201(8), 1281–92.
- Van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., & Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *Journal of immunology*, 6521–5.
- Venuprasad, K., Chattopadhyay, S., & Saha, B. (2003). CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. *Human immunology*, 64(1), 38–43.
- Venuprasad, K., Banerjee, P. P., Chattopadhyay, S., Sharma, S. Pal, S., Parab, P. B., Mitra, D., Saha, B. (2002). Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN- γ secretion and restriction of *Leishmania* growth. *The journal immunology*, 169, 920-028.
- Xiaoxiao, W., Y. Sibiao, X. Xiaopeng, Z. Ping, and C. Gang. (2007). Neutrophils induce the maturation of immature dendritic cells: a regulatory role of neutrophils in adaptive immune responses. *Immunol Invest* 36:337-350.
- Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., & Lo-Man, R. (2009). Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity*, 31(5), 761–71.
- Zhang, X., Gonçalves, R., Mosser, D. M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Wiley Interscience*.