



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



JACILARA ALEXANDRINO CONCEIÇÃO

**O PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR CAUSADA POR *Leishmania braziliensis***

Salvador, BA
2014

JACILARA ALEXANDRINO CONCEIÇÃO

**O PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR CAUSADA POR *Leishmania braziliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar

Salvador, BA
2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

C744 Conceição, Jacilara Alexandrino

O papel dos neutrófilos na leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania braziliensis* – BA / Jacilara Alexandrino Conceição. – Salvador, 2014.

97 f.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Olívia Amado Ramos Bacellar.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Leishmaniose tegumentar. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Neutrófilos. 4. Imunopatogênese. I. Bacellar, Maria Olívia Amado Ramos. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.993.161

Àquele que me criou, me deu Vida, e tem me conduzido durante toda essa caminhada. A Jesus Cristo, meu Senhor e Deus, em quem habita toda a plenitude da ciência.

Aos meus amados pais, Lázaro e Jaciara, por todo suporte, encorajamento, paciência e amor, sem os quais nada disso teria sido possível.

À minha irmã, Laíse e meu cunhado, Tiago, pelo incentivo, carinho, compreensão e sorrisos proporcionados.

Aos meus irmãos em Cristo, todos os familiares e amigos por estarem ao meu lado e me darem força.

A todos estes que tornaram essa caminhada mais leve e feliz, e fizeram tudo valer à pena.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Olívia Bacellar, por ter me acolhido em seu laboratório e confiado esse projeto a mim; pela disposição e paciência em orientar; pelo exemplo de dedicação e profissionalismo e pelo aprendizado e crescimento que me proporcionou ter nesses últimos três anos.

Ao Dr. Edgar Carvalho, chefe do Serviço de Imunologia, pelas valiosas contribuições com este estudo.

Aos colegas do Laboratório de Imunoregulação:

- Pedro Paulo Carneiro, por todo apoio no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, companheirismo e por ter tornado as viagens à Corte de Pedra mais divertidas;
- Aline Muniz e Angela Giudice por cooperarem na realização dos experimentos, pelas discussões geradas que muito contribuíram com o trabalho.
- Thiago Cardoso, pelo apoio essencial na padronização das técnicas desenvolvidas;
- Ludmila Polari e Michael Macedo, por cada contribuição e pela boa convivência.

Aos colegas do Posto de Saúde de Corte de Pedra, em especial a Ednaldo e Neusa Lago, que foram importantes no recrutamento e inclusão dos pacientes no estudo.

À equipe de funcionários do Serviço de Imunologia que viaja quinzenalmente para Corte de Pedra diagnosticando e acompanhando o tratamento dos pacientes: Dr. Paulo Machado, Dr. Luiz Henrique Guimarães, Juliana Almeida e Viviane Magalhães.

Aos pacientes e voluntários que aceitaram participar deste estudo.

Ao Richard Davis pelo trabalho em colaboração, por todo auxílio e discussão dos dados.

À Jaqueline Pereira, funcionária da casa em Corte de Pedra, pelo zelo e cuidado nos serviços prestados.

Ao Anderson Guimarães e Natália Tavares pelas importantes contribuições.

Ao Dr. Lucas Carvalho pela boa vontade e atenção em responder dúvidas sempre que solicitado.

À Dra. Sara Passos pelo auxílio durante o aprendizado da técnica de Citometria de Fluxo.

À Jamille Fernandes pelo incentivo ao meu ingresso no Serviço de Imunologia.

A cada um dos colegas do Serviço de Imunologia, por colaboraram direta ou indiretamente com o progresso deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Imunologia, em especial à secretária Dilcea Oliveira.

Aos colegas/amigos do Programa de Pós-Graduação em Imunologia, por tornarem o ambiente de aprendizado mais prazeroso e pelas contribuições profissionais e pessoais.

“Quem somente observa o vento nunca semeará, e o que olha para as nuvens nunca segará.”

Eclesiastes 11:4

RESUMO

O PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR CAUSADA POR *Leishmania braziliensis*

Introdução: Pacientes com leishmaniose cutânea (LC) desenvolvem uma resposta inflamatória, caracterizada por alta produção de TNF- α e IFN- γ , que são essenciais na morte do parasito, mas contribuem com o desenvolvimento das lesões. Como a resposta imune adaptativa não está associada à proteção na leishmaniose tegumentar, é importante compreender o papel da resposta imune inata na patogênese da LC. Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras da *Leishmania*, os neutrófilos (PMN) são as primeiras células a migrarem para o sítio de infecção e podem promover a morte do parasito. Diversos estudos têm demonstrado a participação dos PMN na resposta inicial à infecção em modelos experimentais de leishmaniose cutânea. No entanto, o papel dos PMN na leishmaniose cutânea humana causada por *L. braziliensis* ainda não é conhecido.

Objetivo: Avaliar o papel dos neutrófilos na leishmaniose tegumentar humana causada por *L. braziliensis*. **Materiais e Métodos:** Neutrófilos de pacientes com LC (n=21) e de controles sadios (CS) (n=17) foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 5 parasitos por célula. A frequência de neutrófilos infectados e a carga parasitária foram quantificadas por microscopia óptica após coloração pelo método de Panótico, das lâminas preparadas por citocentrifugação. Marcadores de ativação e de migração (CD66b, CD11b e CD62L) bem como a produção de *burst* oxidativo mensurada pela fluorescência de DHR-123 foram avaliadas por citometria de fluxo. A produção de metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9), CXCL9 e CXCL10 (quimiocinas envolvidas na ativação e recrutamento de células Th1) foi avaliada através do teste imunoenzimático (ELISA). **Resultados:** Após 180 minutos de infecção com *L. braziliensis*, os neutrófilos de pacientes com LC foram mais infectados do que os neutrófilos de controles sadios. Baseado na expressão de CD66b e de CD11b, os neutrófilos de pacientes foram menos ativados após infecção, quando comparados com os CS. A frequência de neutrófilos de pacientes expressando CD62L não reduziu após a infecção, possivelmente indicando capacidade migratória reduzida. O parasito induziu maior produção de *burst* oxidativo nos neutrófilos de pacientes do que nos de controles sadios e aumentou a produção de MMP-9 em ambos os grupos. Após a infecção com o parasito, os neutrófilos de pacientes com LC produziram maior concentração de CXCL9 do que os de controles sadios, indicando que estas células de pacientes com LC podem participar do recrutamento de outras células envolvidas com a progressão da doença. **Conclusão:** Nossos dados demonstraram, pela primeira vez, que os neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea apresentam um perfil de ativação diferente dos neutrófilos de controles sadios. Esses dados sugerem que os neutrófilos podem contribuir com a patogênese da doença através do recrutamento e ativação das células Th1.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar; *L. braziliensis*; neutrófilos, imunopatogênese.

ABSTRACT

THE ROLE OF NEUTROPHILS IN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS CAUSED BY *Leishmania braziliensis*

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL) patients produce an inflammatory response, characterized by high levels of TNF- α and IFN- γ , that are required to kill *Leishmania* parasite but also contribute to lesion development. Interestingly, the onset of an adaptive immune response is not associated with protective immunity. Therefore it is important to understand the role of the innate immune response. Although macrophages are the principal host cells of the parasite, neutrophils (PMN) are the first cells to migrate to the site of infection and can promote parasite killing. Several studies have demonstrated that PMN participate in the initial response in experimental models of cutaneous leishmaniasis. However the role of PMN in human CL caused by *Leishmania braziliensis* is still unknown. **Objective:** To evaluate the role of neutrophils in human cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis*. **Materials and Methods:** Neutrophils from CL patients (n=21) and healthy subjects (HS) (n=17) were infected with *L. braziliensis* at a parasite-to-PMN ratio of 5:1. Activation markers (CD66b, CD62L and CD11b) as well the production of oxidative burst measured by DHR-123 fluorescence were evaluated by flow cytometry. The production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), CXCL9 and CXCL10 (chemokines related to activation and recruitment of Th1 cells) were detected by a sandwich ELISA technique. **Results:** After 180 minutes, neutrophils from CL patients were more infected than neutrophils from healthy subjects. Based on CD66b and CD11b expression, neutrophils from CL patients were less activated upon infection than cells from HS. The frequency of neutrophils from CL patients expressing CD62L was not reduced after infection, possibly indicating impaired migratory ability. The parasite induced higher production of oxidative burst by neutrophils from CL patients than from HS and increased production of MMP-9 in both groups. After infection with the parasite, neutrophils from CL patients produced higher levels of CXCL9 than neutrophils from HS indicating that the cells from CL patients may participate in the recruitment of other cells involved with disease progression. **Conclusion:** For the first time, our data demonstrated that neutrophils from cutaneous leishmaniasis patients exhibit a different profile of activation than neutrophils from healthy subjects. These data suggest that neutrophils may contribute to the pathogenesis of disease through the recruitment and activation of Th1 cells.

Keywords: Tegumentary leishmaniasis; *L. braziliensis*; neutrophils, immunopathogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL3/MIP1- α - Proteína inflamatória de macrófagos 1- α

CCL4/MIP1- β - Proteína inflamatória de macrófago 1- β

CD- Do inglês CD: *Cluster of Differentiation* (Cluster de Diferenciação)

CEA- Do inglês: Carcinoembryonic antigen (Antígeno Carcinoembrionário)

CFSE- Carboxifluoresceína succinimidil éster

CMSP- Células mononucleares do sangue periférico

CR- Receptor do complemento

CS- Controles sadios

CXCL10/IP-10- Proteína induzida por Interferon gama

CXCL9/MIG- Monocina induzida por Interferon gama

DHR- Dihidrorodamina

FITC- Isocianato de fluoresceína

IFN- γ - Interferon gama

TNF- Fator de necrose tumoral

IL- interleucina

Lb- *Leishmania braziliensis*

LC- Leishmaniose cutânea

LCD- Leishmaniose cutânea difusa

LM- Leishmaniose mucosa

LT- Leishmaniose tegumentar

LV- Leishmaniose visceral

MIF- Média de intensidade de fluorescência

MMP-9- Metaloproteinase de matriz-9

MPO- Mieloperoxidase

NADPH- Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NE- Elastase Neutrófila

NETs- Redes Extracelulares de Neutrófilos

PE- Ficoeritrina

PE-Cy7- Ficoeritrina Cianina 7

PerCP-Cy5.5- Do inglês: *Peridinin-Chlorophyll-Protein complex*; Cy: *Cyanine*

PMA- Forbol 12-miristato 13-acetato

PMN- Leucócitos polimorfonucleares

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SC- Indivíduos com infecção subclínica

SFB- Soro fetal bovino

Th- Linfócitos T *helper* (auxiliares)

TLR- Receptores do tipo Toll

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estratégia representativa de seleção de neutrófilos infectados e <i>bystander</i> , e expressão do marcador CD62L.....	24
Figura 2- Representação gráfica da produção de burst oxidativo por neutrófilos a partir da seleção da população celular por tamanho e granulosidade.....	25
Figura 3- Avaliação da infecção e da carga parasitária de neutrófilos após a infecção com <i>L. braziliensis</i>	30
Figura 4- Expressão de marcadores de CD66b na superfície de neutrófilos de pacientes LC e de controles sadios (CS) após 90 minutos de infecção com <i>L. braziliensis</i> ou estímulo com PMA.....	32
Figura 5- Frequência de neutrófilos de pacientes com LC e de controles sadios expressando CD62L na superfície de neutrófilos de pacientes LC e de controles sadios (CS) após 90 minutos de infecção com <i>L. braziliensis</i> ou estímulo com PMA.....	35
Figura 6- Expressão de CD11b na superfície de neutrófilos de pacientes LC e de controles sadios (CS) após 90 minutos de infecção com <i>L. braziliensis</i> ou estímulo com PMA.....	38
Figura 7- Produção de <i>burst</i> oxidativo pelos neutrófilos de pacientes com LC após infecção com <i>L. braziliensis</i>	40
Figura 8- Proliferação de parasitos internalizados pelos neutrófilos após infecção <i>in vitro</i> com <i>L. braziliensis</i>	42
Figura 9- Viabilidade de promastigotas extracelulares em cultura de neutrófilos de pacientes com LC e controles sadios após infecção com <i>L. braziliensis</i>	44
Figura 10- Produção de MMP-9 pelos neutrófilos de pacientes com LC após 180 minutos de infecção com <i>L. braziliensis</i>	46

Figura 11- Produção de CCL4 dos neutrófilos de pacientes com LC após 180 minutos de infecção com <i>L. braziliensis</i>	48
Figura 12- Produção de CXCL9 por neutrófilos de pacientes com LC após a infecção com <i>L. braziliensis</i>	50
Figura 13- Produção de CXCL10 por neutrófilos de pacientes com LC após a infecção com <i>L. braziliensis</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes com leishmaniose cutânea e controles sadios.....	28
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1	Epidemiologia das Leishmanioses.....	4
2.2	Agente Etiológico e Transmissão da Leishmaniose.....	5
2.3	Aspectos Clínicos das Leishmanioses.....	6
2.4	Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Tegumentar.....	6
2.5	Neutrófilos e suas Características.....	8
2.6	Neutrófilos na Infecção por <i>Leishmania</i>	11
3	JUSTIFICATIVA.....	15
4	HIPÓTESE.....	15
5	OBJETIVOS.....	16
5.1	Objetivo Geral.....	16
5.2	Objetivos Específicos.....	16
6	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	17
6.1	Área de Estudo.....	17
6.2	Definição dos Casos.....	18
6.2.1	Leishmaniose Cutânea (LC).....	18
6.2.2	Controles Sadios (CS).....	18
6.2.3	Critérios de Inclusão.....	18

6.2.4	Critérios de Não Inclusão.....	18
6.3	Desenho de Estudo.....	19
6.4	Considerações Éticas.....	19
6.5	Parasito.....	20
6.6	Metodologia.....	21
6.6.1	Obtenção de Neutrófilos do Sangue Periférico.....	21
6.6.2	Infecção <i>in vitro</i> de Neutrófilos com <i>L. braziliensis</i>	22
6.6.3	Avaliação da Infecção de Neutrófilos com <i>L. braziliensis</i>	22
6.6.4	Avaliação da Expressão de CD62L, CD66b e CD11b em Neutrófilos.....	23
6.6.5	Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) pelos Neutrófilos após Infecção com <i>L. braziliensis</i>	25
6.6.6	Viabilidade de Promastigotas.....	26
6.6.7	Proliferação de Amastigotas nos Neutrófilos.....	26
6.6.8	Dosagem de MMP-9, CXCL9, CXCL10 e CCL4.....	26
6.7	Análise Estatística.....	27
7	RESULTADOS.....	28
7.1	Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da População Estudada.....	28
7.2	Avaliação da Infecção e da Carga Parasitária em Neutrófilos de Pacientes após Infecção <i>in vitro</i> com <i>L. braziliensis</i>	29
7.3	Expressão de Marcadores de Ativação na Superfície de Neutrófilos de Pacientes após Infecção com <i>L. braziliensis</i>	31
7.4	Avaliação da Produção de <i>Burst</i> Oxidativo pelos Neutrófilos de Pacientes com LC e Controles Sadios após Infecção <i>in vitro</i> com <i>L. braziliensis</i>	39

7.5	Proliferação de Parasitos Internalizados pelos Neutrófilos de Pacientes com LC.....	41
7.6	Avaliação da Viabilidade de Promastigotas de <i>L. braziliensis</i> Extracelulares nas Culturas de Neutrófilos de Pacientes com LC e de Controles Sadios.....	43
7.7	Quantificação da Produção de MMP-9 pelos Neutrófilos de Pacientes com LC após Infecção por <i>L. braziliensis</i>	45
7.8	Produção de CCL4 pelos Neutrófilos de Pacientes com LC após Infecção <i>in vitro</i> com <i>L. braziliensis</i>	47
7.9	Produção de Quimiocinas do Tipo Th1 pelos Neutrófilos de Pacientes com LC.....	49
8	DISCUSSÃO.....	53
9	SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	61
10	CONCLUSÃO.....	62
11	FUTURAS DIREÇÕES.....	63
12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
13	ANEXOS.....	76

1 INTRODUÇÃO GERAL

As leishmanioses são doenças parasitárias não contagiosas causadas por diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, apresentam ampla distribuição geográfica atingindo 98 países com um número anual de 1,6 milhões de casos e possuem variadas manifestações clínicas, sendo as principais, a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar.

No Brasil tanto a leishmaniose tegumentar quanto a visceral são endêmicas e apresentam-se em expansão geográfica. Nas regiões norte e nordeste ocorrem as maiores incidências da leishmaniose tegumentar. Na Bahia, a incidência também é elevada, 29,9/100.000 habitantes, sendo distribuída principalmente em áreas agrícolas. A vila de Corte de Pedra, localizada no município de Tancredo Neves a 280 km de Salvador, registra as maiores incidências de leishmaniose tegumentar no Estado, onde em um período de vinte anos foram notificados 12.424 casos da doença (JIRMANUS et al., 2012).

Nas Américas são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose tegumentar e no Brasil a principal espécie causadora desta doença é a *Leishmania braziliensis*.

A leishmaniose tegumentar compreende um espectro diverso de manifestações clínicas que variam desde uma única lesão cutânea ao comprometimento irreversível das mucosas. A leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada pelo aparecimento de lesão ulcerada infiltrada na pele, com bordas elevadas que pode se manifestar como uma lesão única, sendo chamada neste caso de leishmaniose cutânea localizada, ou por diversas lesões nodulares não ulceradas ricas em amastigotas e espalhadas por todo corpo, sendo classificada como leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) (CARVALHO et al., 1994). Cerca de 3% dos indivíduos acometidos pela LC progride para a forma mais severa da doença, a leishmaniose mucosa (LM), que provoca múltiplas ulcerações destrutivas nas mucosas da boca, laringe, nariz e faringe. (JONES et al., 1987; MARSDEN, 1985; LESSA et al., 2007)

Pacientes com leishmaniose cutânea desenvolvem uma resposta do tipo Th1, com elevada produção de IFN- γ e TNF, eficiente na erradicação dos parasitos que, no entanto, comprovadamente, provocam as lesões características e a progressão da doença (ANTONELLI et al., 2005; BACELLAR et al., 2002; BITTENCOURT & BARRAL, 1991; MENDES et al., 2013)

Ao serem inoculadas no hospedeiro, as promastigotas de *Leishmania* interagem com diversos tipos celulares da imunidade inata, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras do parasito, os neutrófilos são as primeiras a migrarem para o local de infecção, e em grande quantidade (BEIL et al., 1992; MÜLLER et al., 2001; PETERS et al., 2008). Considerando-se que os eventos iniciais da resposta imune inata desencadeiam uma resposta imune adaptativa específica, é importante compreender a contribuição dos neutrófilos na resposta contra a leishmaniose.

Alguns estudos em modelo experimental de leishmaniose têm mostrado o papel relevante dos neutrófilos, que varia com o perfil de susceptibilidade ou resistência do hospedeiro, e a espécie do parasito. A depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c susceptíveis provoca a redução da carga parasitária nas lesões e nos linfonodos desses animais após a infecção com *L. major*, contrariamente ao que ocorre nos animais C57BL/6 resistentes após a depleção destas células (TACCHINNI-COTTIER et al., 2000). Enquanto no modelo de infecção por *Leishmania amazonensis* a depleção dos neutrófilos leva ao rápido desenvolvimento de lesões e aumento na carga parasitária no camundongo BALB/c, a depleção dessas células não interfere no curso da infecção no animal C57BL/6 resistente (SOUSA, 2014). Um estudo mostrou que os neutrófilos também apresentam diferentes fenótipos que variam com o perfil de resistência do hospedeiro, com a expressão diversificada de receptores semelhantes à Toll (TLRs), secreção e transcrição de diferentes citocinas, que podem influenciar o desenvolvimento de uma resposta imune específica (CHARMOY et al., 2007).

Parasitos do gênero *Leishmania* induzem a ativação dos mecanismos microbicidas dos neutrófilos (LAUFS et al., 2002) que em alguns casos contribuem com o controle da infecção (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009; AFONSO et al.,

2008; NOVAIS et al., 2009) ou favorecem a sobrevivência do parasito (MOLLINEDO et al., 2010). A maioria dos estudos sobre o papel dos neutrófilos na leishmaniose foi realizada em modelo experimental e com diferentes espécies do parasito, mas estudos com *L. braziliensis*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar na área de estudo de Corte de Pedra, ainda não foram realizados. Considerando-se também que a progressão da doença está relacionada com a espécie de *Leishmania* infectante, a região geográfica e a fatores da resposta imune do hospedeiro, é importante caracterizar o papel dos neutrófilos na leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis*, sendo este o objetivo deste estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, com distribuição mundial e espectro clínico variado, destacando-se as leishmanioses tegumentar e visceral.

A globalização econômica e o aumento da migração de indivíduos não imunes para áreas endêmicas favoreceram a expansão da distribuição geográfica da leishmaniose, que é endêmica em 98 países e atinge principalmente a África, Ásia, Américas do Sul e Central. São cerca de 1,6 milhões de novos casos em todo o mundo anualmente, sendo 1,2 milhões de leishmaniose cutânea e 400 mil de leishmaniose visceral (ALVAR et al., 2012).

As leishmanioses representam um grande problema de saúde pública pela alta endemicidade, elevado risco de infecção e capacidade de produzir deformidades, com consequências no âmbito sócio-econômico pelo acometimento de indivíduos em faixa etária produtiva. Assumindo que praticamente todas as mortes são por leishmaniose visceral, cuja estimativa de letalidade, é superior a 10%, chega-se a um número preliminar de 40 mil mortes por ano devido à leishmaniose. (ALVAR et al., 2012)

No Brasil, tanto a leishmaniose visceral como a tegumentar são endêmicas e apresentam-se em expansão geográfica. A forma visceral atinge 22 estados e tem uma prevalência de 3.500 novos casos por ano, enquanto a forma tegumentar é descrita em vários municípios de todo o país, sendo registrados em média cerca de 30.000 novos casos ao ano. A maior incidência da doença está nas regiões norte e nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

No estado da Bahia, a incidência também é elevada, 29,9/100.000 habitantes, sendo distribuída principalmente em áreas agrícolas. A vila de Corte de Pedra, localizada no município de Tancredo Neves a 280 km de Salvador, registra as

maiores incidências de leishmaniose tegumentar no Estado, onde no período de 1988 a 2008 foram notificados 12.424 casos da doença (JIRMANUS et al., 2012).

2.2 Agente Etiológico e Transmissão da Leishmaniose

As leishmanioses são causadas por diversas espécies do protozoário do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae), os quais desencadeiam um amplo espectro clínico que varia desde lesões ulceradas na pele até à forma visceral.

As espécies *Leishmania infantum*, *L. donovani* e *L. chagasi* são os agentes etiológicos da leishmaniose visceral no mediterrâneo, na África e Ásia, e nas Américas respectivamente. Quanto à leishmaniose tegumentar, só nas Américas existem 11 diferentes espécies de *Leishmania* responsáveis pelas formas clínicas desta doença. No Brasil, as principais espécies são a *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*.

Os parasitos são inoculados nos hospedeiros vertebrados, através do vetor, flebótomos dos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Ao realizarem o repasto sanguíneo, as fêmeas infectadas dos flebótomos depositam no hospedeiro vertebrado as promastigotas metacíclicas, formas livres, flageladas e infectantes do parasito que são capturadas pelas células fagocíticas do hospedeiro diferenciando-se em amastigotas no interior destas. As amastigotas, formas intracelulares e não flageladas do parasito, quando sobrevivem aos mecanismos microbicidas das células fagocíticas, replicam-se até provocar o rompimento celular sendo liberadas para o meio extracelular e podendo infectar mais células fagocíticas. Neste ciclo de transmissão, o flebótomo fêmea não infectado realiza repasto sanguíneo no hospedeiro infectado e ingere as formas amastigotas. No intestino do flebótomo, as amastigotas transformam-se em promastigotas e diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, dando continuidade ao ciclo de transmissão.

2.3 Aspectos Clínicos das Leishmanioses

A infecção por parasitos do gênero *Leishmania* produz um amplo espectro clínico no qual as duas principais formas são classificadas como leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A leishmaniose tegumentar apresenta diferentes manifestações clínicas que são classificadas como leishmanioses cutânea (LC), mucosa (LM), disseminada (LD), cutânea difusa (LCD) e ainda a infecção subclínica (SC) ou assintomática. As formas clínicas da doença estão relacionadas com a espécie de *Leishmania* infectante, a região geográfica e a fatores da resposta imune do hospedeiro. No Brasil a *Leishmania braziliensis* é o principal agente causal da leishmaniose tegumentar e suas diversas formas clínicas.

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, e é caracterizada pelo aparecimento de uma ou mais lesões ulceradas de fundo granuloso e bordas elevadas, que pode ou não sofrer cura espontânea (MARSDEN, 1985). Pode ser causada por diversos parasitos de *Leishmania* e se manifestar como uma lesão única, sendo chamada neste caso de leishmaniose cutânea localizada, ou por diversas lesões nodulares, não ulceradas, ricas em amastigotas e espalhadas por todo o corpo, sendo neste caso classificada como LCD (CARVALHO et al., 1994). Aproximadamente 3% dos indivíduos com LC desenvolvem a forma mais grave da doença, a leishmaniose mucosa, cujo principal agente causador é a *Leishmania braziliensis*. Os pacientes sofrem com múltiplas ulcerações destrutivas nas mucosas da boca, laringe, nariz e faringe, que podem torná-los permanentemente desfigurados e propensos a comprometimento respiratório, infecções bacterianas secundárias e desnutrição (JONES et al., 1987; MARSDEN, 1985; LESSA et al., 2007).

2.4 Aspectos Imunológicos da Leishmaniose Tegumentar

Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras e responsáveis pela erradicação do parasito, os neutrófilos são as primeiras células a migrar para o local da infecção e em grande quantidade (BEIL et al., 1992; MÜLLER et al., 2001; PETERS et al., 2008). Estudos demonstraram que os neutrófilos

participam do início da infecção por *Leishmania*, sendo recrutados para o local da picada do flebótomo onde fagocitam os parasitos (PETERS et al., 2008; VAN ZANDBERGEN et al., 2002). A produção de IFN- γ por células Th1 também é importante para o controle da infecção, uma vez que esta citocina estimula a produção de óxido nítrico e superóxido pelos fagócitos (BOGDAN et al., 2000; LIEW & COX, 1991; MURRAY et al., 1983), moléculas envolvidas na morte do parasito.

Estudos em modelo experimental de leishmaniose tegumentar mostram a dicotomia entre a proteção mediada pelas células Th1, com produção de TNF- α , IFN- γ e IL-2, e a susceptibilidade à doença mediada pelas células Th2 com produção de IL-4 e IL-5 (MOSMANN et al., 1986; revisado por SACKS E NOBENTRAUTH, 2002). Em humanos, a produção de IFN- γ na ausência da ativação das células Th1 é baixa ou ausente. Isto resulta na perda da capacidade de destruição dos parasitos de *Leishmania* pelos macrófagos, levando ao aparecimento das formas disseminadas da leishmaniose, como a leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea difusa (BONFIM et al., 1996; CARVALHO et al., 1988). O desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 capaz de controlar a proliferação dos parasitos não impede a progressão da doença nas formas cutânea e mucosa. A avaliação histopatológica das lesões de pacientes com LC e LM mostram um processo inflamatório com linfócitos e plasmócitos, no qual os parasitos são raros ou até mesmo ausentes (BITTENCOURT & BARRAL, 1991; MENDES et al., 2013).

Atualmente, já está comprovado que a resposta imune participa da lesão tecidual na leishmaniose tegumentar. Pacientes com LC e LM apresentam alta produção de IFN- γ e TNF, mas ao invés de controlar a infecção, desenvolvem úlceras cutâneas e mucosas (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) destes mesmos pacientes, quando estimuladas com antígeno solúvel de *L. braziliensis in vitro*, produzem muito pouco ou não produzem IL-10 e a adição exógena desta citocina não regula a produção de IFN- γ e TNF nesses pacientes (BACELLAR et al., 2002). Foi mostrado também que existe uma associação entre a produção de IFN- γ e TNF e o tamanho da lesão, assim como o aparecimento de formas mais graves da doença (ANTONELLI et al., 2005). Outros estudos mostraram ainda que a pentoxifilina, que é um inibidor de

TNF, potencializa os efeitos benéficos do antimonial pentavalente (droga padrão utilizada no tratamento da leishmaniose) indicando o envolvimento desta citocina no dano tecidual observado na doença (LESSA et al., 2001; MACHADO et al., 2007).

Em contraste com estas formas clínicas de infecção causada por *L. braziliensis*, cerca de 12% dos indivíduos residentes em uma área de transmissão de *L. braziliensis*, apesar de serem expostos a este parasito, não apresentam evidências de doença clínica (FOLLADOR et al., 2002). Estes indivíduos apresentam reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* positiva (teste de Montenegro) e/ou produção de IFN- γ específica para o antígeno de *Leishmania* e são considerados como tendo uma forma subclínica da doença (SCHNNOR et al., 2012). Linfócitos de indivíduos com a forma subclínica (SC) da infecção por *L. braziliensis* não produzem ou apresentam uma produção menor de IFN- γ e TNF- α quando comparados com pacientes com LC após estímulo *in vitro* com antígeno de *L. braziliensis* (FOLLADOR et al., 2002; NOVOA et al., 2011).

Como na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, a resposta imune adaptativa através da forte resposta do tipo Th1 está associada com a patogênese e progressão da doença, e sabendo-se que a resposta imune inata contribui com a sinalização e desenvolvimento de uma resposta imune específica é importante compreender a participação da imunidade inata na patogênese da leishmaniose.

2.5 Neutrófilos e suas Características

Os neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMN) são células geradas continuamente na medula óssea e originadas de precursores mielóides sob a ação do fator estimulante de colônia de granulócitos, G-CSF. Durante a sua maturação, os neutrófilos passam por diversos estágios, de mieloblasto até a sua forma mais madura, células polimorfonucleares, apresentando sua morfologia característica com núcleo segmentado. Os neutrófilos constituem a população mais abundante de leucócitos circulantes e são as primeiras células recrutadas para o local de infecção mediando as fases mais iniciais das respostas inflamatórias.

A migração dos neutrófilos para o local de infecção ocorre através de um processo que envolve o rolamento e a adesão destas células sobre o endotélio dos vasos, e a transmigração para o sítio inflamatório. Estas etapas envolvem alterações na expressão de moléculas de superfície destas células, que são essenciais para a efetuação do processo.

Após o reconhecimento e fagocitose do patógeno, as células fagocíticas residentes nos tecidos produzem citocinas que estimulam a expressão de integrinas e selectinas além da produção de quimiocinas pelas células endoteliais.

Os neutrófilos associam-se ao endotélio através da interação dos seus ligantes com as integrinas exibidas pelas células endoteliais. Um dos principais ligantes expressos de maneira constitutiva na superfície dos neutrófilos é a L-selectina (CD62-L), uma glicoproteína que participa dos eventos de rolamento e adesão ao endotélio (VENTURI et al., 2003; VON ADRIAN et al., 1993). A perda de L-selectina favorece o rápido rolamento dos neutrófilos no endotélio e tem sido utilizada como um marcador de ativação destas células. (HAFEZI-MOGHADAN et al., 2001; LAUFS et al., 2002)

Após a transmigração, os polimorfonucleares chegam aos tecidos onde podem atuar no controle inicial da infecção pela ação dos seus mecanismos microbicidas. Um destes mecanismos é a fagocitose, que permite a contenção intracelular dos microrganismos e favorece a ação localizada dos radicais reativos formados pelos neutrófilos e também a fusão dos grânulos contendo enzimas microbicidas (GUEIRARD et al., 2008). A fagocitose de microrganismos ativa o sistema NADPH oxidase ligado à membrana, o qual é importante na produção de radicais reativos de oxigênio (ROS) que atuam diretamente na morte dos microrganismos (URIARTE et al., 2011; VETHANAYAGAM et al., 2011; revisado por SEGAL, 2005; revisado por HAMPTON et al., 1998). Os grânulos neutrofílicos contêm proteases, e também atuam como um dos mecanismos microbicidas dos neutrófilos através da fusão com os fagolisossomos formados ou da degranulação. Tais grânulos são classificados de acordo com seu conteúdo proteico e com as suas habilidades diferenciais de serem excitados (revisado por PHAM, 2006; revisado por DINAUER et al., 2000). Os subgrupos de grânulos neutrofílicos contêm não

apenas proteínas antimicrobianas, proteases e componentes da explosão respiratória, mas também muitos receptores ligados a membranas participantes da adesão endotelial, proteínas da matriz extracelular e mediadores solúveis da inflamação (revisado por FAURSCHOU E BORREGAARD, 2003). Os grânulos azurófilos, os primeiros a serem formados e os últimos a serem exocitados, são constituídos por mieloperoxidase (MPO), defensinas e algumas serino proteases como a elastase neutrofílica (NE). Os grânulos secundários ou específicos contêm lisozimas, lactoferrinas e CD66 dentre outras moléculas. A molécula CD66 constitui um subgrupo da família de antígenos carcinoembrionários (CEA), induz um sinal de ativação que aumenta a adesão dos neutrófilos ao endotélio e possui quatro variações, CD66a, CD66b, CD66c e CD66d (SKUBITZ & SKUBITZ, 2010). Dentre estes, o CD66b tem sido utilizado, em alguns estudos, como um marcador de ativação dos neutrófilos (LAUFS et al., 2002). Dentre os conteúdos dos grânulos terciários estão três metaloproteinases denominadas colagenase (metaloproteinase de matriz-8 (MMP-8)), gelatinase (MMP-9) e leucolisina (MMP-25) (revisado por FAURSCHOU E BORREGAARD, 2003). Estas metaloproteinases são enzimas proteolíticas capazes de remodelar a matriz extracelular sob condições fisiológicas e patológicas. Estudos demonstraram que a MMP-9 é responsável pela migração excessiva dos neutrófilos no trato respiratório em resposta ao vírus Influenza (BRADLEY et al., 2012) e apontam para um importante papel da MMP-9 na patogênese de algumas doenças inflamatórias. Por fim, existem os grânulos secretórios que são reservatórios de receptores associados à membrana necessários nas fases mais iniciais da resposta inflamatória mediada pelos neutrófilos (revisado por FARSCHOU E BORREGAARD, 2003). Estes grânulos são ricos em CR3, CR1 e CD16. Estes três constituem-se receptores especializados no reconhecimento de microrganismos necessário para a ativação dos mecanismos celulares efetores. O CR3 (CD11b/CD18 ou Mac-1) é o receptor da fração C3b do complemento e está relacionado ao reconhecimento de microrganismos opsonizados por esta molécula; o CR1 é o receptor das frações C3b/C4b do complemento e o CD16 é um receptor de baixa afinidade da porção Fc de anticorpos IgG.

Outro mecanismo no controle das infecções são as armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs), formadas por DNA, histonas e grânulos, capazes de deter os patógenos (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009; MCCORMICK et al., 2010).

2.6 Neutrófilos na Infecção por *Leishmania*

Ao penetrar no hospedeiro a *Leishmania* interage com diferentes tipos celulares da resposta imune inata, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras para a *Leishmania*, os neutrófilos migram rapidamente e em grande quantidade para o local da infecção (BEIL et al., 1992; MÜLLER et al., 2001; PETERS et al., 2008).

A análise histológica da lesão no modelo murino de infecção causada por *L. braziliensis*, mostrou um infiltrado inflamatório misto, composto por células mononucleares e polimorfonucleares (DE MOURA et al., 2005). Contrariamente ao que ocorre no modelo murino, o infiltrado inflamatório nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea é composto por diversos tipos celulares como macrófagos, linfócitos, plasmócitos e muito raros ou nenhum neutrófilo (BITTENCOURT & BARRAL, 1991; MENDES et al., 2013; DANTAS et al., 2013). Quanto à imunopatogênese da infecção causada por *L. braziliensis*, o modelo murino mostrou ser similar ao que ocorre com pacientes com leishmaniose. Houve a formação de uma lesão com fundo granulomatoso e bordas elevadas na área de inoculação do parasito nos animais BALB/c susceptíveis. A resposta imune desenvolvida após a infecção foi predominantemente do tipo Th1, com elevada produção de IFN- γ e baixa produção de IL-4 e IL-10 (DE MOURA, 2005).

Um recente estudo demonstrou a presença dos neutrófilos nas lesões na leishmaniose mucosa e sugeriu a participação destas células na patogênese da doença (BOAVENTURA et al., 2010). No referido estudo, foi demonstrado que os neutrófilos presentes nas lesões apresentavam intensa produção de elastase neutrofílica, mieloperoxidase e MMP-9 (BOAVENTURA et al., 2010), enzimas relacionadas com a potencialização de mecanismos microbicidas e com a progressão da lesão.

No modelo de infecção causada por *Leishmania major*, a dicotomia Th1 e Th2 tem papel fundamental na resistência ou susceptibilidade à infecção. Neste caso, em camundongos BALB/c susceptíveis, a depleção de neutrófilos provoca a redução da carga parasitária nas lesões (TACCHINNI-COTTIER et al., 2000; NOVAIS et al., 2009) e nos linfonodos desses animais após a infecção com *L. major*, contrariamente ao que ocorre nos animais C57BL/6 resistentes após a depleção destas células.

Foram observadas também diferenças qualitativas e quantitativas no início da resposta inflamatória contra *L. major* em animais resistentes ou susceptíveis à infecção por esse parasito. Em animais BALB/c susceptíveis, os neutrófilos constituem a maioria das células recrutadas no primeiro dia após a inoculação do parasito, e representam 50% do infiltrado celular 10 dias após infecção. Em contraste, em animais resistentes, os neutrófilos contribuem com 60% do infiltrado celular no primeiro dia após a infecção. Entretanto, três dias depois, essas células representam somente 1-2% do infiltrado celular, sendo os monócitos as células predominantes (BEIL et al., 1992).

Além disso, após infecção por *L. major*, neutrófilos de camundongos susceptíveis e resistentes adquirem diferentes fenótipos. Os neutrófilos de camundongos resistentes infectados por *L. major*, apresentam uma maior produção de IL-12p70 e uma maior expressão de RNAm para diferentes receptores do tipo Toll (TLRs), como TLR2, TLR7 e TLR9, quando comparados aos dos animais susceptíveis (CHARMOY et al., 2007). Tendo em vista que esses receptores desencadeiam vias de sinalização que levam a ativação de diferentes fatores de transcrição e expressão de genes codificadores de citocinas e quimiocinas, eles podem influenciar o desenvolvimento de uma resposta imune específica.

A secreção de quimiocinas por neutrófilos após infecção por *L. major* também é importante no recrutamento de células dendríticas nos primeiros dias de infecção. Neutrófilos de camundongos resistentes C57BL/6 secretam mais CCL3 do que neutrófilos de animais susceptíveis BALB/c após infecção por *L. major*. Isto resulta em um maior recrutamento de células dendríticas da pele e de células dendríticas derivadas de monócitos no animal resistente quando comparado com o animal

susceptível. Estes achados sugerem que a secreção de determinadas quimiocinas pelos neutrófilos no início da infecção pode regular o desenvolvimento da resposta imune específica contra o parasito (CHARMOY et al., 2010).

Outros estudos com indivíduos saudáveis também têm buscado compreender a interação dos neutrófilos humanos com a *Leishmania*, na qual tem sido observada a ativação fenotípica e os mecanismos microbicidas destas células, que algumas vezes não são capazes de deter o parasito, podendo contribuir com a sua sobrevivência. Em alguns casos, a ativação fenotípica tem sido demonstrada através da expressão das moléculas CD66b, proteína localizada nos grânulos terciários que está associada a adesão endotelial (FORTUNATI et al., 2009; STOCKS et al., 1995), e CD62L, selectina envolvida no rolamento e migração dos neutrófilos para o sítio de infecção (HAFEZI-MOGHADAM et al., 2001; VON ADRIAN et al., 1993). O fenótipo ativado dos neutrófilos tem sido caracterizado pelo aumento da expressão de CD66b e redução do percentual de células expressando CD62L (LAUFS et al., 2002; BEZERRA et al., 2011).

Quanto aos mecanismos microbicidas dos neutrófilos, a *Leishmania* promove a indução da explosão respiratória nestas células (LAUFS et al., 2002; PEARSON & STEIGBIGEL, 1981), bem como a liberação de DNA e conteúdos granulares que atuam na morte de patógenos, as chamadas NETs, que são mais produzidas após o contato com a *Leishmania* e capazes de deter o parasito (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009). Outro mecanismo microbicida produzido por estas células é a fusão dos grânulos neutrofílicos com o vacúolo parasitóforo formado após a fagocitose da *Leishmania*, o fagolisossomo (revisado por PHAM, 2006). Esse processo que expõe o patógeno a proteases e peptídeos anti-microbianos contidos nos grânulos favorece sua eliminação pela ação de enzimas proteolíticas. Foi demonstrado que a *L. major* estimula a fusão de grânulos neutrofílicos aos fagolisossomos contendo parasitos, contudo, de maneira seletiva favorecendo sua própria sobrevivência (MOLLINEDO et al., 2010).

Além de possuírem mecanismos microbicidas que podem atuar na morte do parasito e no controle inicial da leishmaniose, os neutrófilos também interagem com os macrófagos, células hospedeiras finais da *Leishmania*, responsáveis pela

eliminação do parasito. Alguns estudos caracterizam os neutrófilos como células hospedeiras intermediárias que albergam a *Leishmania* até que ela possa infectar, de maneira silenciosa e sem reconhecimento, os macrófagos recrutados que se instalam no sítio inflamatório dias após a infecção (revisado por LASKAY et al., 2008). Isto se torna possível devido ao aumento da sobrevivência dos neutrófilos em consequência do retardo da apoptose espontânea provocado pela infecção por *Leishmania*. (AGA et al, 2002).

Os neutrófilos também interagem com outros tipos celulares na resposta imune contra a leishmaniose. Foi demonstrado que o contato com o neutrófilo exerce influência na infecção de macrófagos por *Leishmania*. A cocultura com neutrófilos apoptóticos contribui com o aumento da carga parasitária em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (AFONSO et al., 2008) enquanto neutrófilos viáveis favorecem a morte da *L. braziliensis* pelos macrófagos (NOVAIS et al., 2009).

3 JUSTIFICATIVA

Como na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, a resposta imune adaptativa através da forte resposta do tipo Th1 está associada com a patogênese e progressão da doença, e sabendo que a resposta imune inata contribui com a sinalização e desenvolvimento de uma resposta imune específica, é importante compreender a participação da imunidade inata na patogênese da leishmaniose tegumentar humana causada por *L. braziliensis*.

Alguns estudos têm demonstrado um papel relevante dos neutrófilos na leishmaniose, evidenciando que o fenótipo destas células tem influenciado uma resposta imune específica contra os parasitos do gênero *Leishmania*. No entanto, na maioria destes estudos que avaliam o comportamento dos neutrófilos na leishmaniose foram utilizados modelos experimentais de infecção e, considerando que o estabelecimento e progressão da doença variam de acordo com as características do hospedeiro e a espécie de *Leishmania* infectante, faz-se necessário avaliar o comportamento dos neutrófilos de pacientes com leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis* comparando a neutrófilos isolados de indivíduos saudáveis.

4 HIPÓTESE

Os neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis* apresentam comportamento distinto dos neutrófilos de indivíduos saudáveis, sendo mais infectados, tendo maior expressão de marcadores de ativação e maior produção de *burst* oxidativo após contato in vitro com *L. braziliensis* do que o grupo controle.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel dos neutrófilos na leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis*.

5.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a capacidade de infecção e multiplicação de *L. braziliensis* em neutrófilos de pacientes com LC e de controles sadios após infecção *in vitro*;
2. Avaliar a expressão de marcadores de superfície (CD62L, CD66b e CD11b) em neutrófilos infectados nos dois grupos;
3. Determinar a produção do *burst* oxidativo por essas células após a infecção com *L. braziliensis*.
4. Determinar a produção de MMP-9, CXCL9, CXCL10 e CCL4 por essas células após a infecção com *L. braziliensis*.

6 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Área de Estudo

Corte de Pedra é um vilarejo rural pertencente ao município de Presidente Tancredo Neves, no sudoeste da Bahia. Localiza-se a aproximadamente 30 km da região de Três Braços e 280 km de Salvador. No entanto, a área endêmica de Corte de Pedra é formada por cerca de 20 municípios que estão contidos dentro de uma área de, aproximadamente, 10.000 km². A área que era dominada pela Mata Atlântica, ao longo do tempo foi reduzida a pontos isolados de mata secundária, e hoje é formada em quase toda a sua extensão por áreas agrícolas desmatadas. A principal fonte de renda para a maioria dos habitantes da região é a agricultura de subsistência, que tornou a população altamente exposta à infecção por *L. braziliensis*, transmitidos principalmente por *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia*, flebotomíneos endêmicos na fauna local (MIRANDA et al., 2002). Esta é a região onde são registradas as mais altas taxas de incidência da doença do estado.

Em 1986 foi construído um posto de saúde na região de Corte de Pedra que se tornou referência para diagnóstico e tratamento da leishmaniose. Desde então, o Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES) realiza assistência médica a pacientes com leishmaniose tegumentar e desenvolve trabalhos de pesquisa clínica e imunológica nesta área endêmica. Quinzenalmente, médicos vinculados ao Serviço de Imunologia, incluindo clínicos, imunologistas, infectologistas, dermatologistas e otorrinolaringologistas, visitam o posto de saúde de Corte de Pedra promovendo o atendimento médico para a população da região. O posto também conta com o apoio de 4 agentes de saúde treinados, residentes no vilarejo, que prestam assistência aos pacientes, visitam as famílias e participam das atividades de pesquisa.

6.2 Definição dos Casos

6.2.1 Leishmaniose Cutânea (LC)

É definida como a presença de uma lesão ulcerada na pele, sem evidência de envolvimento da mucosa. O diagnóstico é realizado pela detecção do parasito através da cultura do aspirado da lesão, ou pelo achado da lesão típica associado ao teste positivo de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* (Reação de Montenegro) e histopatologia compatível com leishmaniose tegumentar. Atualmente, o diagnóstico também tem sido realizado através da Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa (qPCR) de biópsias das amostras das lesões.

6.2.2 Controles Sadios (CS)

Indivíduos adultos não residentes na área endêmica de Corte de Pedra, sem apresentarem diagnóstico positivo para outras doenças infecciosas e sem história pregressa de leishmaniose tegumentar americana, que aceitaram participar do estudo.

6.2.3 Critérios de Inclusão

Pacientes com LC, atendidos no posto de saúde de Corte de Pedra, foram selecionados de acordo com os critérios e definição de casos descritos acima. Foram incluídos pacientes com duração da doença não superior a 60 dias, que ainda não haviam sido submetidos ao tratamento para leishmaniose, com no máximo três lesões cutâneas e que aceitaram participar do estudo.

6.2.4 Critérios de Não Inclusão

Pacientes com sorologia positiva para HIV e portadores de doenças debilitantes como insuficiência renal, insuficiência hepática e diabetes mellitus; indivíduos que tenham feito uso de drogas imunossupressoras ou apresentando condições que pudessem alterar a resposta imune ou ainda que contra indicassem a

doação de sangue para avaliação sorológica como, por exemplo, menores com idade inferior a 15 anos e gestantes.

6.3 Desenho de Estudo

Este foi um estudo de corte transversal em pacientes com leishmaniose cutânea. Foi avaliado um total de 21 pacientes com LC e 17 indivíduos sadios, através de diferentes experimentos, sendo que não necessariamente todos os pacientes foram incluídos em alguns experimentos.

As análises imunológicas foram realizadas antes do tratamento para todos os pacientes que participaram do estudo.

6.4 Considerações Éticas

Este estudo faz parte de um projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Parecer/Resolução nº 025/2012).

Todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (vide em anexo).

Todos os pacientes diagnosticados com leishmaniose tegumentar, atendidos no posto de saúde de Corte de Pedra, independentemente de participarem do estudo ou não, foram tratados com antimonial pentavalente, o tratamento padrão recomendado pela Organização Mundial de Saúde.

Este estudo foi financiado pela National Institute of Health- EUA, NIH-AI30639 e AI088650.

6.5 Parasito

Foram utilizadas promastigotas de *L. braziliensis* obtidos a partir de uma biópsia da lesão cutânea de um paciente com LC, proveniente da área endêmica de Corte de Pedra, sendo inicialmente cultivadas em meio bifásico (NNN). Após o isolamento, os parasitos foram criopreservados em nitrogênio líquido no Serviço de Imunologia do Com-HUPES.

Para a infecção *in vitro* de neutrófilos foram utilizados parasitos da espécie *L. braziliensis* (MHOM/BR/LTCP11245) caracterizados quanto à espécie pelo método de eletroforese de enzima *multicolus* (CUPOLILLO et al., 1994). Foram utilizadas formas promastigotas do parasito na fase estacionária de crescimento obtidas a partir do cultivo do isolado LTCP 11245 em meio segundo Schneider (LGC Biotecnologia, Brasil). O referido isolado foi retirado do nitrogênio líquido e descongelado em temperatura ambiente. Em seguida, foi transferido para um tubo contendo 10ml de RPMI 1640 (Gibco®, Grand Island, NY, EUA) e centrifugado durante 10 minutos a 2000 rpm numa temperatura de 4°C. O sobrenadante foi então substituído por salina e o procedimento de centrifugação foi repetido por mais duas vezes até que 1ml de meio segundo Schneider foi adicionado ao material obtido e finalmente foi transferido para um frasco de cultura contendo 4ml do mesmo meio. A cultura foi mantida em estufa a 24°- 26°C.

Durante sete dias, os estágios de desenvolvimento do parasito foram acompanhados, realizando-se a contagem de promastigotas viáveis de *L. braziliensis* a fim de identificar o início da sua fase estacionária, que foi de cerca de 3 a 4 dias após o repique.

Ao atingirem a fase estacionária, as promastigotas foram submetidas a duas lavagens com salina 0,9% a 3000 rpm durante 10 minutos sendo então mantidas em 1ml de meio Schneider para a realização da contagem de promastigotas viáveis em câmara de Neubauer e para manutenção da viabilidade do parasito. Após a quantificação e no período mais próximo à infecção *in vitro*, as promastigotas foram novamente lavadas em salina a 0,9% nas mesmas condições descritas anteriormente, então o meio RPMI foi adicionado.

Em alguns experimentos, os parasitos foram corados com o marcador de proliferação celular CFSE (carboxifluoresceína succinimidil éster) a 5mM: após duas lavagens com salina a 0,9% por 10 minutos a 3000 rpm, formas promastigotas do parasito foram colocadas em 5ml de salina, constituindo a Solução I. O volume de 10µl de CFSE foi diluído em 240µl de salina e, para cada 60×10^6 parasitos foram adicionados 2,5µl do diluído à 5 ml de salina formando a Solução II. Em seguida, as Soluções I e II foram unidas e incubadas por 5 minutos a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, na ausência de luz. Após este período, foram realizadas mais duas lavagens com uma solução contendo 5 ml de salina a 0,9% e 2ml de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco®).

Os parasitos corados com CFSE foram mantidos em RPMI 1640 até o momento da infecção.

6.6 Metodologia

6.6.1 Obtenção de Neutrófilos do Sangue Periférico

Foram coletados 30ml de sangue total heparinizado que foi diluído 1:2 em salina a 0,9% a temperatura ambiente e o isolamento de células foi realizado através do gradiente de densidade *Ficoll Hypaque* (LSM; Organon, Durham, NC).

Após centrifugação a 1490 rpm por 30 minutos a 25°C foi formado o anel de células mononucleares que então foi aspirado e desprezado. Ao restante do conteúdo centrifugado, foi adicionado igual volume de Dextran (Pharmacosmos A/S, Denmark) a 3% em salina, e após homogeneização o tubo foi mantido em repouso durante 20 minutos para permitir a sedimentação das hemácias. Depois deste período, o sobrenadante contendo neutrófilos foi aspirado e transferido para um novo tubo, sendo submetido a duas lavagens com salina a 0,9% por 10 minutos a 1400 rpm e 25°C.

Os neutrófilos purificados foram mantidos em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro autólogo ou 10% de SFB, ajustados numa concentração de 1×10^6 células/ml.

6.6.2 Infecção *in vitro* de Neutrófilos com *L. braziliensis*

Os neutrófilos mantidos em RPMI com 10% de soro autólogo foram submetidos ao contato com o parasito numa proporção de 5 promastigotas para cada célula; as células mantidas em RPMI com 10% de SFB não foram estimuladas para constituir o controle negativo ou foram estimuladas com 10ng/ml de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como controle positivo.

Após os estímulos, os neutrófilos foram incubados em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C durante 10, 90 e 180 minutos. Depois de cada período de infecção, os sobrenadantes destas culturas foram obtidos após centrifugação e armazenados a -20°C para posterior dosagem de quimiocinas e MMP-9.

6.6.3 Avaliação da Infecção de Neutrófilos com *L. braziliensis*

Lâminas de neutrófilos infectados foram preparadas através da técnica de citocentrifugação da seguinte maneira: aos tubos contendo neutrófilos submetidos à infecção *in vitro*, após a coleta do sobrenadante, foi adicionado 1ml de salina a 0,9% e uma alíquota de 50µl foi centrifugada sobre lâmina de microscopia, por 2 minutos a 500 rpm. As lâminas foram coradas com Panótico Rápido (LB, Laborclin, PR, Brasil) e a infecção dos neutrófilos foi avaliada por microscopia óptica.

As lâminas preparadas foram observadas em objetiva de imersão sendo contabilizada a taxa de infecção dos neutrófilos nos períodos de 10, 90 e 180 minutos através da contagem do número de neutrófilos infectados, não infectados, bem como do número de amastigotas internalizadas em um total de 100 células.

6.6.4 Avaliação da Expressão de CD62L, CD66b e CD11b em Neutrófilos

Neutrófilos não estimulados, infectados com *L. braziliensis* marcadas com CFSE ou estimulados com 10ng/ml de PMA durante 90 minutos, foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD62L e anti-CD11b conjugados com fluorocromo PE-Cy7 e anti-CD66b conjugado com PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA).

Após a marcação, as células foram lavadas e ressuspensas em salina. Cerca de 50.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo BD FACSVerse™ e a análise dos dados foi realizada utilizando-se o software *FlowJo* (Tree Star, Inc., Ashland, EUA).

A amostra controle não marcada com anticorpos monoclonais infectada ou não por *L. braziliensis* marcada com CFSE, e os controles isotópicos também foram adquiridos e analisados como descrito acima.

Antes da aquisição das amostras foi realizado o controle de qualidade do citômetro bem como o ajuste das fluorescências para compensação automática das amostras através do uso de beads específicas do próprio fabricante, em todos os experimentos nos quais este aparelho foi utilizado.

A figura 1 mostra a estratégia representativa utilizada para selecionar a população de neutrófilos, a população de neutrófilos infectados (CFSE+), aqueles que foram submetidos ao contato com o parasito porém não foram infectados, os chamados *bystander* (CFSE-) e a expressão de um dos marcadores de superfície avaliados. A estratégia utilizada foi a mesma para todos os outros marcadores, no entanto, nos neutrófilos não estimulados e naqueles estimulados por PMA não houve subdivisão da população selecionada por tamanho e granulosidade, sendo a expressão dos marcadores de superfície avaliadas diretamente nesta população.

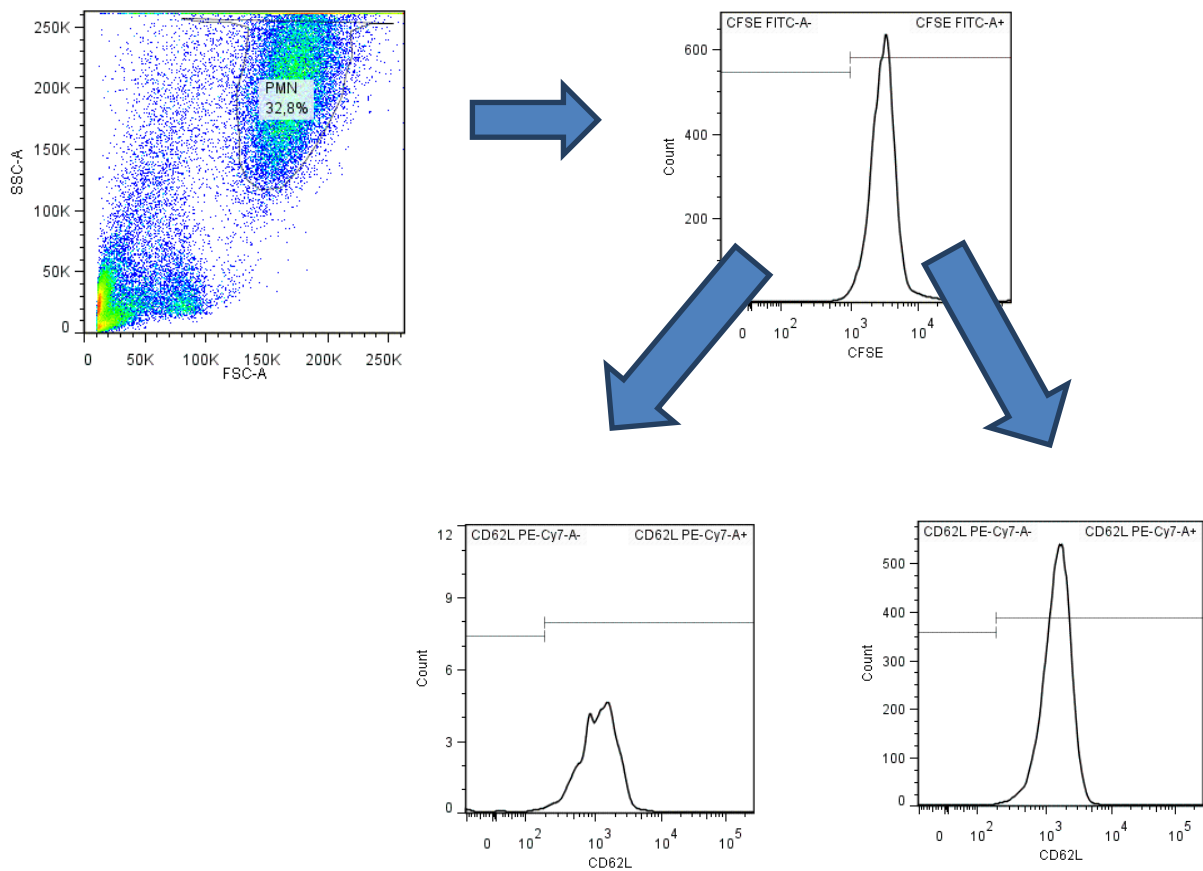


Figura 1: Estratégia representativa de seleção de neutrófilos infectados e *bystander*, e expressão do marcador CD62L. A população de neutrófilos foi selecionado por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), em seguida foi subdividida em neutrófilos infectados e *bystander* através da expressão positiva e negativa de CFSE, respectivamente. Dentro destas duas subpopulações foi avaliada a expressão dos marcadores de superfície, no caso representado, de CD62L.

6.6.5 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) pelos Neutrófilos após Infecção com *L. braziliensis*

Para avaliar a produção do *burst* oxidativo através da citometria de fluxo, à cultura de neutrófilos foi adicionado um indicador de espécies reativas, *Dihydrorhodamine 123*, o DHR (Cayman Chemical Company, Michigan, EUA) na concentração de 10ng/ml durante 15 minutos a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Logo após, os neutrófilos foram submetidos ao contato com *L. braziliensis* ou estimulados com PMA durante 10 minutos, como descrito anteriormente no item 6.5.2.

Após lavagem e ressuspensão em salina, as células foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSVerse™ e a análise dos dados foi realizada utilizando-se o software *FlowJo*. A estratégia utilizada para a seleção da população de neutrófilos e população DHR+ está representada na figura 2.

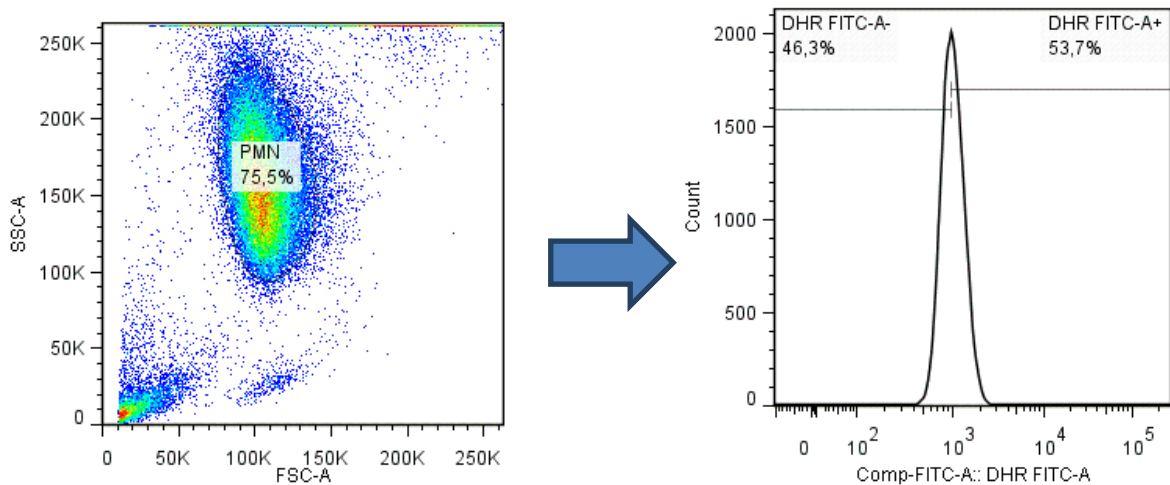


Figura 2: Representação gráfica da produção de burst oxidativo por neutrófilos a partir da seleção da população celular por tamanho e granulosidade. A produção do burst oxidativo foi detectada através da expressão de DHR+ (FITC).

6.6.6 Viabilidade de Promastigotas

Os neutrófilos obtidos do sangue periférico foram submetidos ao contato com *L. braziliensis* na proporção de 5 parasitos por célula durante 180 minutos. Após a infecção as culturas foram centrifugadas por duas vezes com salina a 0,9% durante 10 minutos a 1000 rpm, para a remoção dos parasitos não internalizados pelos neutrófilos. Então as células foram ressuspensas em Meio Segundo Schneider e incubadas a 24°C.

Após 1 hora, uma alíquota de 100µl da cultura foi transferida para a câmara de Neubauer para quantificação das promastigotas viáveis extracelulares, em seguida, foram novamente incubadas e após 24 horas foi realizada uma nova quantificação. A observação das promastigotas foi feita através de microscópio óptico.

6.6.7 Proliferação de Amastigotas nos Neutrófilos

Após isolamento, neutrófilos foram submetidos ao contato com *L. braziliensis* marcada com CFSE durante 10, 90, 180 minutos e 24 horas. Ao término de cada período, as culturas foram lavadas e ressuspensas em salina a 0,9%; em seguida foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSVerse™ e a avaliação da proliferação de parasitos internalizados, na forma de amastigotas, foi realizada utilizando-se o software *FlowJo*.

6.6.8 Dosagem de MMP-9, CXCL9, CXCL10 e CCL4

Os sobrenadantes das culturas de neutrófilos infectados com o parasito por 10, 90 e 180 minutos, foram coletados e as concentrações de MMP-9, CXCL9 e CXCL10 e CCL4 foram detectadas através do método imunoenzimático ELISA sanduíche utilizando-se reagentes comercialmente disponíveis (BD Pharmingen e R&D Systems, Minneapolis, MN). Os resultados foram expressos em pg/ml baseados em uma curva padrão gerada a partir de MMP-9, CXCL9 e CXCL10 e

CCL4 recombinantes. A sensibilidade dos ensaios de quimiocinas foi de 7,8 pg/ml e de 15,6pg/ml para MMP-9.

6.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA*).

Assumindo que a distribuição das amostras não seguia uma distribuição Gaussiana, as análises foram feitas com testes não paramétricos.

Para a comparação dos resultados obtidos com as células dos mesmos indivíduos submetidas a diferentes condições de cultura, foi utilizado o teste pareado de amostra de Wilcoxon, enquanto o teste não paramétrico de Mann Whitney foi utilizado para as comparações entre os grupos (pacientes com LC e controles sadios). Um erro α de 5% ($p < 0.05$) foi considerado para significância estatística.

7 RESULTADOS

7.1 Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da População Estudada

Para o desenvolvimento deste estudo foram avaliados 21 pacientes com leishmaniose cutânea, residentes na área endêmica de Corte de Pedra, e 17 controles saudáveis, não residentes na área endêmica.

Os dados epidemiológicos e clínicos da população de estudo estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Aspectos epidemiológicos e clínicos dos pacientes com leishmaniose cutânea e controles saudáveis.

	Pacientes	Controles
Número	21	17
Idade (anos)	29,6 (16-53)	32,9 (24-60)
Gênero	12M; 9F	5M; 12F
Tamanho da Lesão (média mm)	14,6x13,3 mm	_____

7.2 Avaliação da Infecção e da Carga Parasitária em Neutrófilos de Pacientes após Infecção *in vitro* com *L. braziliensis*

A avaliação da capacidade da *L. braziliensis* infectar os neutrófilos de pacientes com LC foi realizada através da quantificação da frequência de células infectadas e do número de amastigotas internalizadas a cada 100 neutrófilos por microscopia óptica.

A figura 3A compara o percentual de infecção dos neutrófilos de pacientes e de controles sadios nos diferentes períodos de tempo. Nos períodos de 10 e 90 minutos não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores da frequência de infecção dos neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e dos neutrófilos de controles sadios (CS). Todavia, no período de 180 minutos, uma maior frequência de neutrófilos de pacientes com LC foram infectados quando comparados aos controles sadios 89% (68-94) *versus* 85,5% (75-89), * $p < 0.05$.

Entretanto, não houve diferença entre a carga parasitária observada nos neutrófilos de pacientes e de controles sadios em nenhum dos períodos de infecção avaliados, como apresentado na figura 3B.

A figura 3C é representativa da infecção de neutrófilos com *L. braziliensis* no período de 180 minutos.

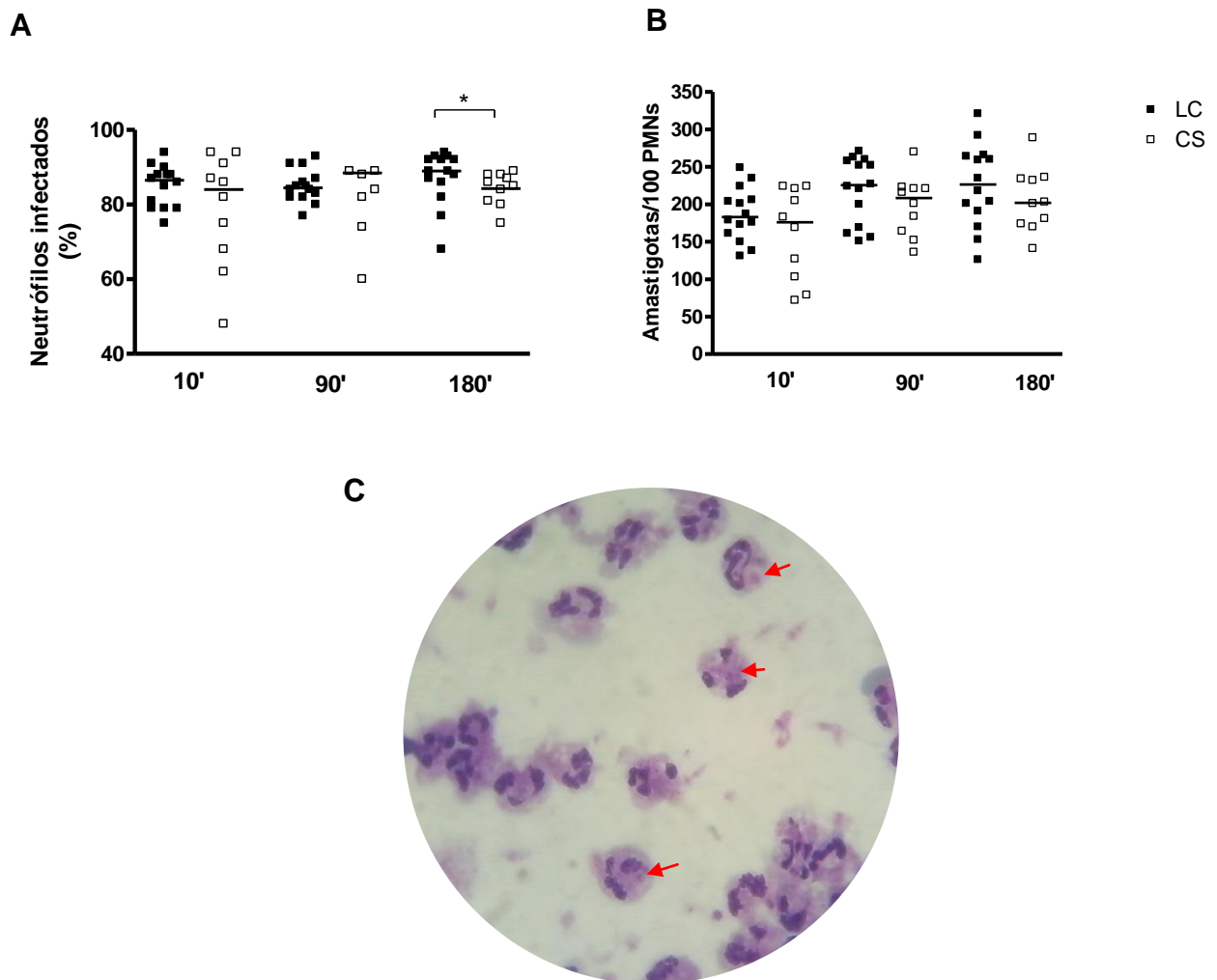


Figura 3: Avaliação da infecção e da carga parasitária de neutrófilos após a infecção com *L. braziliensis*. Neutrófilos obtidos do sangue periférico de pacientes com LC (n=14) e controles saudáveis (n=10) foram infectados com *L. braziliensis* na proporção de 5 parasitos/célula durante 10, 90 ou 180 minutos. A frequência de neutrófilos infectados e a carga parasitária foram avaliadas em lâminas de citocentrifugação através de microscopia óptica. (A) Frequência de neutrófilos infectados com *L. braziliensis*. (B) Carga parasitária obtida através da contagem de amastigotas internalizadas em 100 neutrófilos após a infecção *in vitro*. Os valores são apresentados em mediana e a análise estatística foi realizada através do teste estatístico de Mann Whitney, *p<0.05. (C) Figura representativa da infecção de neutrófilos com *L. braziliensis* no período de 180 minutos. As setas vermelhas indicam as amastigotas internalizadas nos neutrófilos.

7.3 Expressão de Marcadores de Ativação na Superfície de Neutrófilos de Pacientes após Infecção com *L. braziliensis*

A avaliação do fenótipo de ativação dos neutrófilos após a infecção *in vitro* foi realizada através da análise da expressão e frequência dos marcadores de ativação CD66b e CD62L respectivamente.

O CD66b é uma molécula pertencente à família de antígenos carcinoembrionários, localizada nos grânulos secundários dos neutrófilos, por isso o aumento da expressão de CD66b está relacionado com a ativação neutrofílica.

Os resultados apresentados nas figuras 4A e 4B mostram que a expressão de CD66b nos neutrófilos de pacientes com LC aumentou após a infecção (CFSE+) ou contato (CFSE-) com *L. braziliensis* quando comparados com os neutrófilos não estimulados (MEIO). Entretanto, os neutrófilos de pacientes com LC tiveram uma menor expressão (MIF- média de intensidade de fluorescência) de CD66b, 35500(19500-44400), após a infecção (CFSE+) quando comparados aos neutrófilos de controles sadios (□), 47950(35700-90000), como mostra a figura 4C, **p<0.01.

Em contraste, a expressão de CD66b em neutrófilos *bystander* (CFSE-) dos pacientes com LC foi maior, 31300(17800-42200), do que a observada nos neutrófilos de controles sadios, 20200(2273-34000) (figura 4C), *p<0.05.

Estes dados mostram que independentemente da sua internalização, a *L. braziliensis* é capaz de ativar os neutrófilos, tanto do grupo LC quanto do CS.

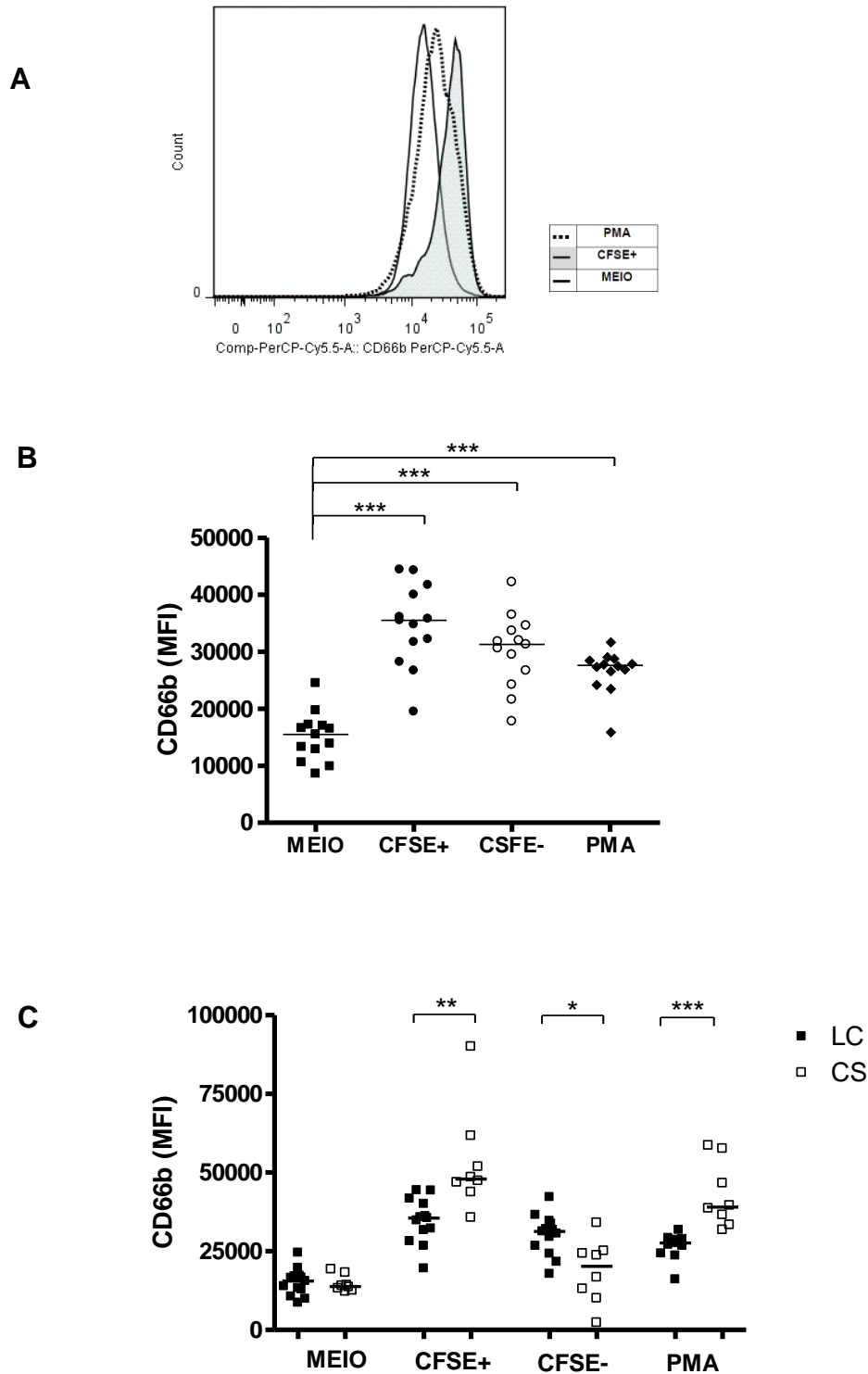


Figura 4: Expressão de marcadores de CD66b na superfície de neutrófilos de pacientes LC e de controles sadios (CS) após 90 minutos de infecção com *L. braziliensis* ou estímulo com PMA. Neutrófilos de pacientes com LC (n=13) e de controles sadios (n=12) foram marcados com anticorpo anti-CD66b. A população de neutrófilos foi selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e a expressão de moléculas de ativação foi avaliada nos neutrófilos não estimulados (MEIO),

infectados com *L. braziliensis* (CFSE+), *bystander* (CFSE-) e estimulados com PMA (PMA). (A) Histograma representativo da expressão de CD66b em neutrófilos de pacientes com LC nas condições MEIO (linha sólida), CFSE+ (histograma cinza) e PMA (linha tracejada). (B) Expressão de CD66b nos neutrófilos de pacientes com LC após 90 minutos de infecção com *L. braziliensis* ou estímulo com PMA. Os valores estão expressos em mediana e foram obtidos através da média de intensidade de fluorescência (MFI) do CD66b. A análise estatística foi realizada pelo teste de Wilcoxon, *** $p < 0.001$. (C) Expressão de CD66b nos neutrófilos de pacientes com LC e controle sadios após 90 minutos de infecção com *L. braziliensis* ou estímulo com PMA. Os valores estão expressos em mediana e foram obtidos através da média de intensidade de fluorescência (MFI) do CD66b. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A L-selectina ou CD62L é uma molécula relacionada à adesão endotelial e migração dos neutrófilos para o sítio de infecção. A redução da CD62L está associada com o rápido rolamento dos neutrófilos durante a migração para os tecidos e é utilizada como um marcador de ativação destas células.

A figura 5A é um histograma representativo da expressão de CD62L em neutrófilos de um paciente com LC após a infecção com *L. braziliensis*.

Baseado na frequência de neutrófilos de LC expressando CD62L não foi observada ativação dessas células após a infecção com *L. braziliensis* quando comparado com a célula não estimulada, pois não foi observada uma redução significativa na frequência de células expressando CD62L.

A frequência de neutrófilos de pacientes com LC expressando CD62L após a infecção com *L. braziliensis* foi maior, 97,1%(71,7-99,6), do que a de neutrófilos de controles sadios, 0,28%(0,34-1,42), *** $p < 0.001$, (figura 5C).

A figura 5B ainda mostra que os neutrófilos *bystander* (CFSE-) de pacientes com LC apresentam menor frequência de CD62L após o contato com *L. braziliensis* em relação ao estado não estimulado (MEIO), mostrando mais uma vez que a *L. braziliensis* não precisa ser internalizada para induzir um perfil de ativação nos neutrófilos.

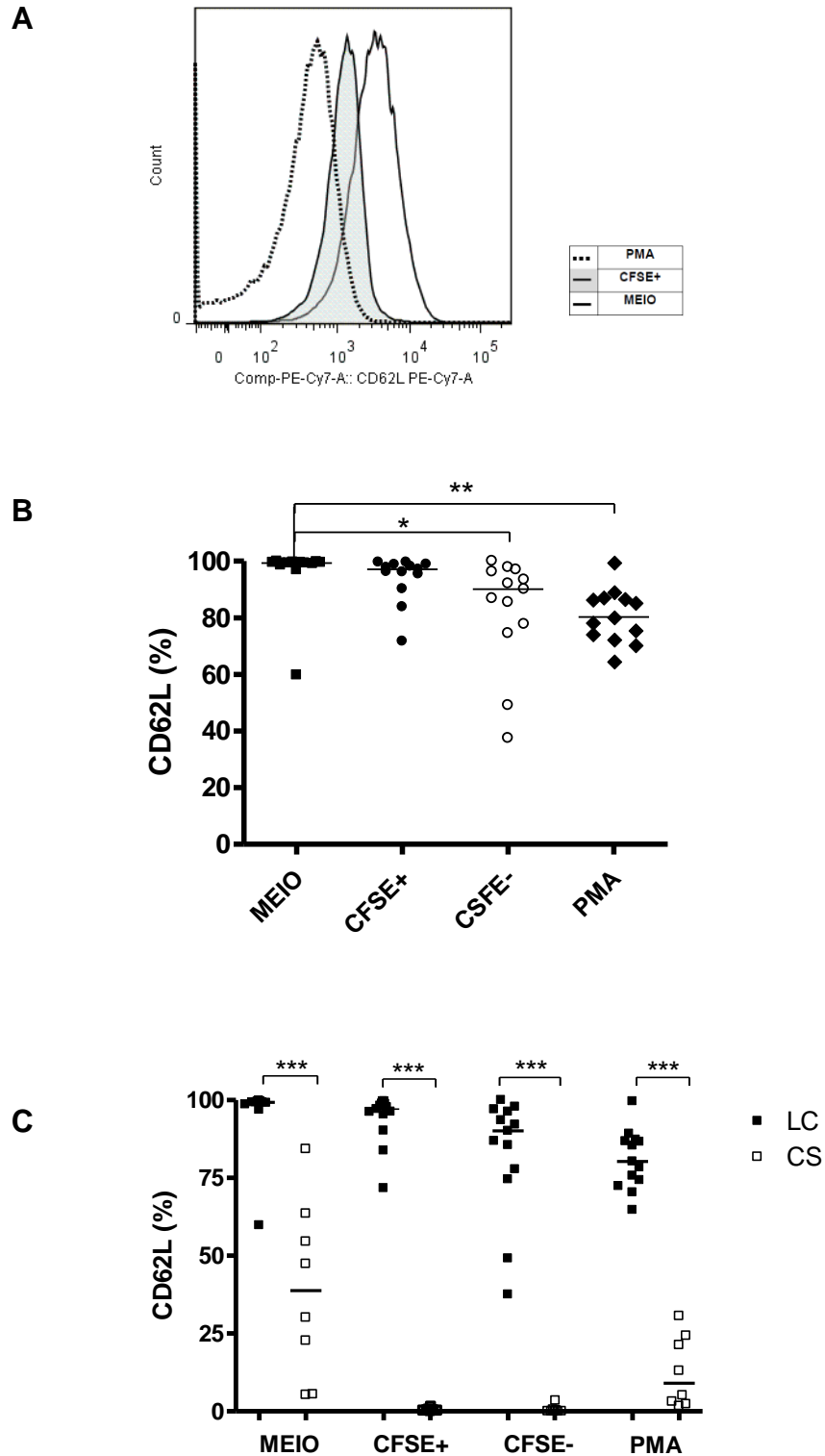


Figura 5: Frequência de neutrófilos de pacientes LC e de controles sadios (CS) expressando CD62L após 90 minutos de infecção com *L. braziliensis* ou estímulo com PMA. Neutrófilos de pacientes com LC (n=13) e de controles sadios (n=8) foram marcados com anticorpos anti-CD62L. A população de neutrófilos foi selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e a expressão de moléculas de ativação foi avaliada nos neutrófilos não estimulados (MEIO), infectados com *L.*

braziliensis (CFSE+), *bystander* (CFSE-) e estimulados com PMA (PMA). (A) Histograma representativo da expressão de CD62L em neutrófilos de pacientes com LC nas condições MEIO (linha sólida), CFSE+ (histograma cinza) e PMA (linha tracejada). (B) Frequência de neutrófilos de pacientes com LC expressando CD62L após 90 minutos de infecção com *L. braziliensis* ou estímulo com PMA. Os valores estão expressos em mediana e foram obtidos através da média de intensidade de fluorescência (MFI) do CD62L. A análise estatística foi realizada pelo teste de Wilcoxon, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (C) Expressão de CD62L nos neutrófilos de pacientes com LC e controle sadios após 90 minutos de infecção com *L. braziliensis* ou estímulo com PMA. Os valores estão expressos em mediana e foram obtidos através da média de intensidade de fluorescência (MFI) do CD62L. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney, *** $p < 0.001$.

A integrina CD11b, localizada nos grânulos neutrofílicos, relacionada à adesão ao endotélio e também ao reconhecimento e internalização de microrganismos ao formar o receptor CR3 em associação com o CD18, teve sua expressão avaliada na superfície dos neutrófilos.

Contrariamente ao esperado, a expressão de CD11b nos neutrófilos de pacientes com LC reduziu após a infecção com o parasito, 81800(47800-88400), em relação à célula não estimulada, 43000(21700-53150), *** $p < 0.001$ (figura 6A).

Após a infecção com *L. braziliensis*, não houve diferença significativa da expressão de CD11b entre os grupos LC e CS em ambos os grupos (figura 6B).

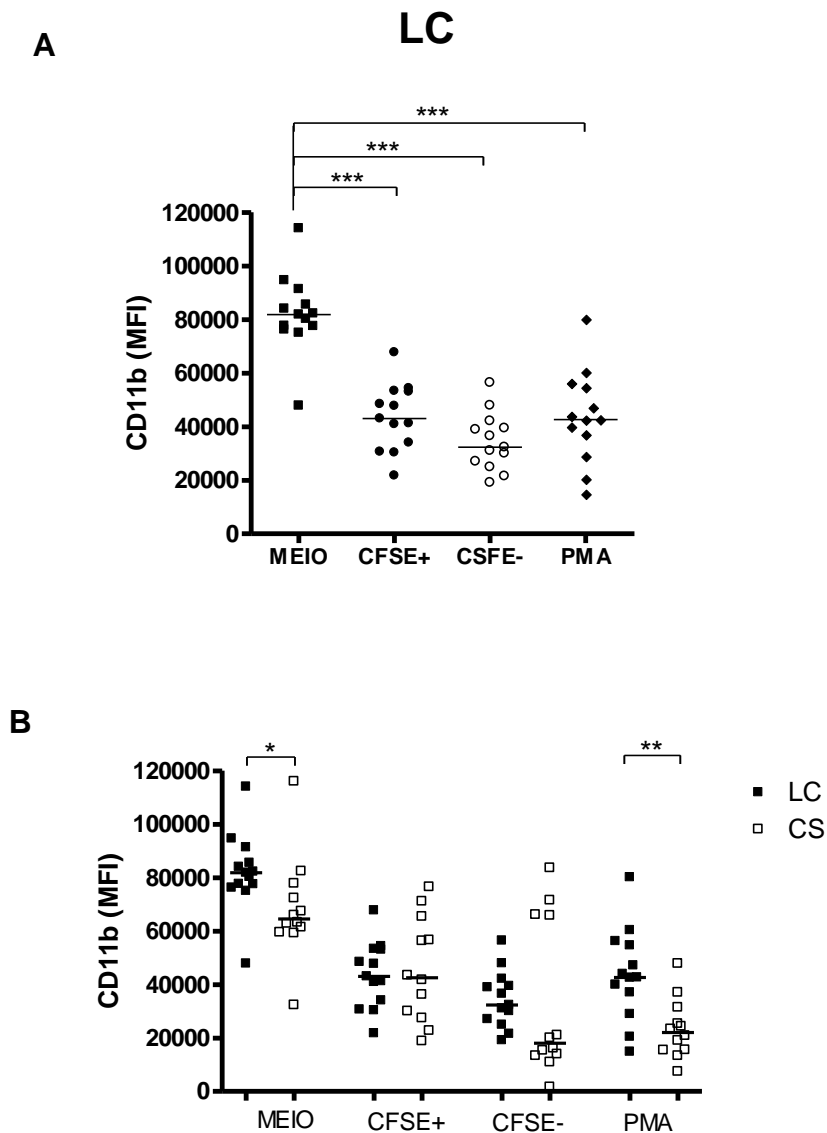


Figura 6: Expressão de CD11b na superfície de neutrófilos de pacientes LC e de controles sadios (CS) após 90 minutos de infecção com *L. braziliensis* ou estímulo com PMA. Neutrófilos de pacientes com LC (n=13) e de controles sadios (n=12) foram marcados com anticorpos anti-CD11b. A população de neutrófilos foi selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e a expressão de moléculas de ativação foi avaliada nos neutrófilos não estimulados (MEIO), infectados com *L. braziliensis* (CFSE+), *bystander* (CFSE-) e estimulados com PMA (PMA). (A) Expressão de CD11b em neutrófilos de pacientes. (B) Expressão de CD11b em neutrófilos de pacientes com LC e de controles sadios após infecção *in vitro* ou estímulo com PMA. Os valores estão expressos em mediana e foram obtidos através da média de intensidade de fluorescência (MFI) da molécula CD11b. O teste estatístico utilizado para as comparações dentro do mesmo grupo foi o teste de Wilcoxon, e o teste de Mann Whitney foi utilizado para a comparação dos valores entre os diferentes grupos, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

7.4 Avaliação da Produção de *Burst* Oxidativo pelos Neutrófilos de Pacientes com LC e Controles Sadios após Infecção *in vitro* com *L. braziliensis*

Para avaliar se a infecção por *L. braziliensis* não apenas induzia um fenótipo de ativação nos neutrófilos como também promovia uma ativação dos mecanismos microbicidas, a produção de *burst* oxidativo pelos neutrófilos foi avaliada através da mensuração da expressão de dihidrorodamina (DHR) por citometria de fluxo.

O histograma representativo na figura 7A mostra que após a infecção com *L. braziliensis* os neutrófilos de pacientes com LC tiveram a expressão de dihidrorodamina aumentada.

Na figura 7B é possível observar que após a infecção com *L. braziliensis* os neutrófilos de pacientes com LC produziram mais *burst* oxidativo, 3250(2860-3797), do que os neutrófilos de CS, 1671(475-3142), *** $p < 0.001$.

Juntos, estes dados mostram que embora os neutrófilos de pacientes com LC apresentem um fenótipo menos ativado do que os de CS, a ativação dos seus mecanismos microbicidas é maior do que a dos neutrófilos do grupo CS.

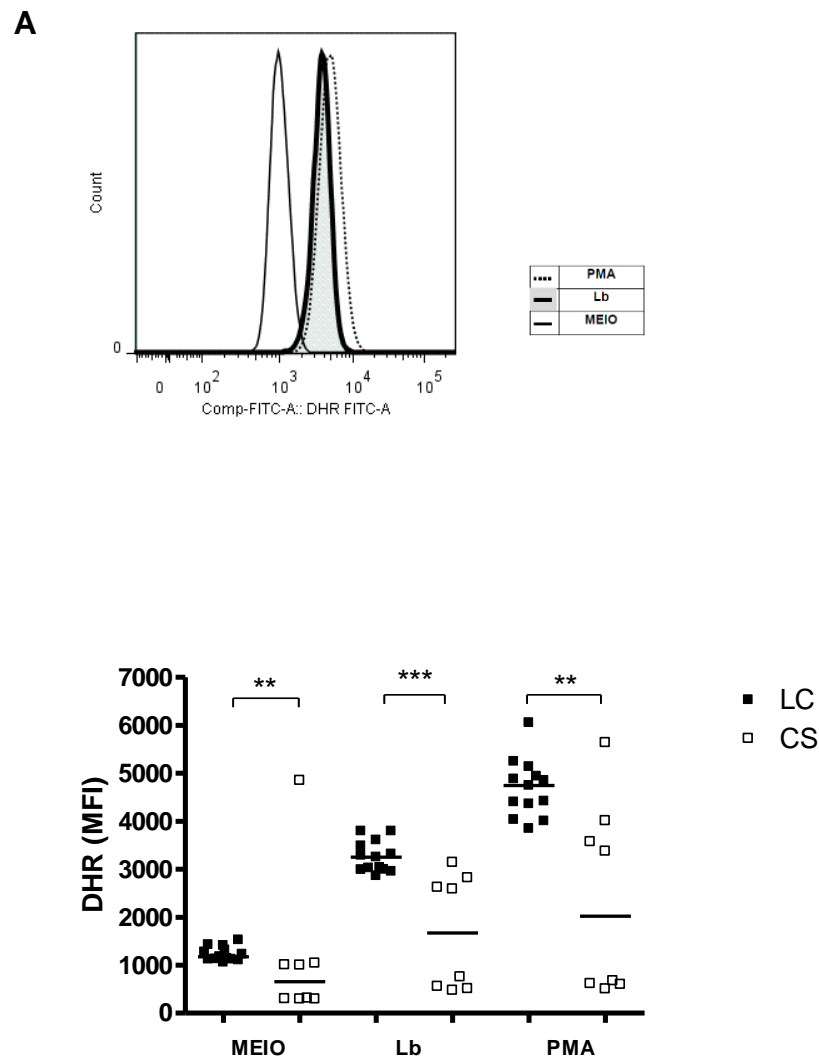


Figura 7: Produção de *burst* oxidativo pelos neutrófilos de pacientes com LC após infecção com *L. braziliensis*. Neutrófilos de pacientes com LC (n=13) e de controles saudáveis (n=8) foram estimulados com dihidrorodamina (DHR) por 15 minutos. Em seguida, as células foram submetidas à interação com *L. braziliensis* ou estímulo com PMA durante 10 minutos. A produção de *burst* oxidativo foi avaliada através da mensuração da expressão de DHR nos neutrófilos não estimulados (MEIO), submetidos ao contato com o parasito (Lb) e estimulados com PMA (PMA). Os valores estão expressos em mediana e foram obtidos através da média de intensidade de fluorescência (MFI) da dihidrorodamina. O teste estatístico de Mann Whitney foi utilizado na análise dos resultados com *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

7.5 Proliferação de Parasitos Internalizados pelos Neutrófilos de Pacientes com LC

A fim de investigar se o *burst* oxidativo produzido pelos neutrófilos de pacientes com LC influenciava o controle da replicação do parasito, a proliferação de *L. braziliensis* no interior dos neutrófilos nos períodos de 10, 90, 180 minutos e 24 horas foi avaliada através de citometria de fluxo.

A redução na expressão de CFSE indica a proliferação do parasito no interior das células.

A figura 8 mostra que a *L. braziliensis* é capaz de replicar-se no interior dos neutrófilos de pacientes. A partir do ponto inicial da infecção, período de 10 minutos, houve uma queda na expressão de CFSE, indicando a proliferação do parasito. No período de 180 minutos foi observado maior declínio na expressão de CFSE, 3143(2581-6411), em relação ao período de 10 minutos, 8315(5467-8481), embora não houve diferença estatisticamente significativa.

Esse resultado sugere que a *L. braziliensis* apresenta capacidade de replicar no interior de neutrófilos de pacientes com LC.

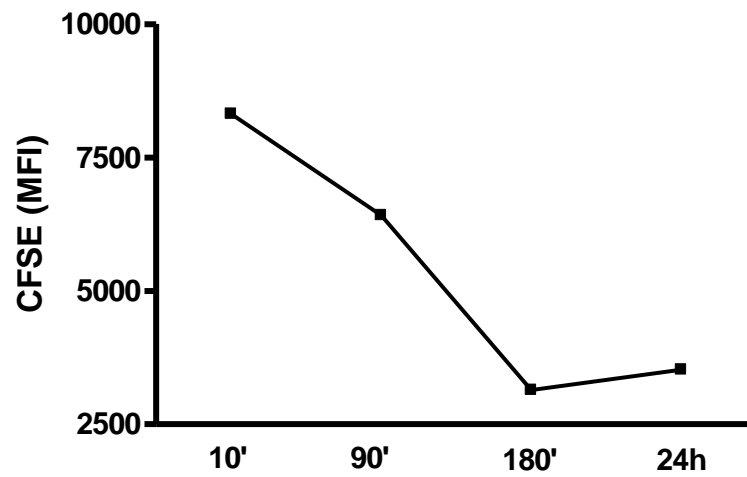


Figura 8: Proliferação de parasitos internalizados pelos neutrófilos após infecção *in vitro* com *L. braziliensis*. Parasitos corados com CFSE foram adicionados aos neutrófilos na proporção de 5 parasitos por célula durante 10, 90, 180 minutos e 24 horas, em seguida a proliferação de *L. braziliensis* foi mensurada pela expressão de CFSE através de citometria de fluxo. Os valores das curvas estão expressos em mediana e para análise estatística foi utilizado o teste de Wilcoxon.

7.6 Avaliação da Viabilidade de Promastigotas de *L. braziliensis* Extracelulares nas Culturas de Neutrófilos de Pacientes com LC e de Controles Sadios

Com a finalidade de investigar se o *burst* oxidativo produzido pelos neutrófilos era eficiente na morte dos parasitos internalizados, a viabilidade das promastigotas que poderiam ser liberadas pelos neutrófilos após 24 horas foi avaliada.

Após 24 horas de incubação houve um aumento significativo no número de promastigotas viáveis no meio extracelular tanto no grupo LC – 3×10^4 ($0-110 \times 10^4$) *versus* 8×10^4 ($0-298 \times 10^4$), com $*p < 0.05$ (figura 9A) - quanto no grupo CS – $3,5 \times 10^4$ ($0-14 \times 10^4$) *versus* $6,25 \times 10^4$ ($0-42 \times 10^4$), com $**p < 0.01$ (figura 9B). Entretanto, não houve diferença significativa quando os valores foram comparados entre os grupos (figura 9C).

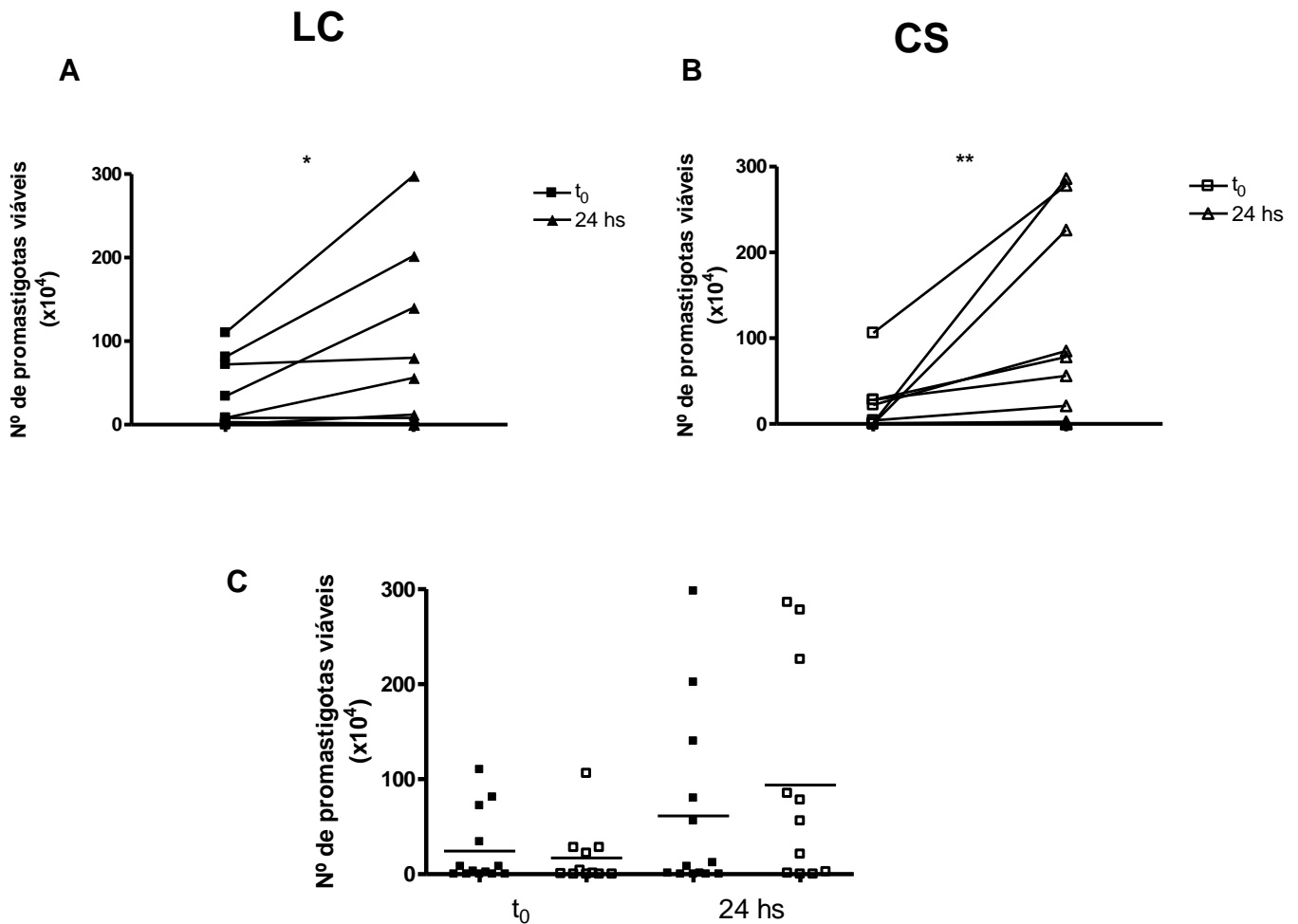


Figura 9: Viabilidade de promastigotas extracelulares em cultura de neutrófilos de pacientes com LC e controles sadios após infecção com *L. braziliensis*. Após 180 minutos de interação com *L. braziliensis*, a cultura de neutrófilos foi centrifugada, para remoção de possíveis parasitos não internalizados, em seguida o meio específico para o crescimento do parasito foi adicionado à cultura que foi incubada a 25°C. Uma hora após a incubação, uma alíquota da cultura foi utilizada para contagem das promastigotas não internalizadas, tendo-se o tempo inicial da avaliação (t_0). Após 24 horas de incubação uma nova contagem foi realizada. (A) Viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* extracelulares na cultura de neutrófilos de pacientes com LC. (B) Viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* extracelulares nas culturas de neutrófilos de controles sadios. (C) Viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* extracelulares nas culturas de neutrófilos de pacientes com LC e controles sadios. O teste estatístico utilizado para a análise dos resultados apresentados nos gráficos A e B foi o teste de Wilcoxon e os valores estão expressos em mediana, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. No gráfico C os valores estão expressos em mediana e o teste estatístico de Mann Whitney foi utilizado para comparação entre os grupos.

7.7 Quantificação da Produção de MMP-9 pelos Neutrófilos de Pacientes com LC após Infecção por *L. braziliensis*

Sabendo-se que a MMP-9 está relacionada com a formação das lesões em pacientes com leishmaniose mucosa causada por *L. braziliensis* (MARETTI-MIRA et al., 2011b), a produção dessa gelatinase pelos neutrófilos de pacientes com LC após infecção *in vitro* com *L. braziliensis* foi quantificada.

Após confecção da curva da cinética da produção de MMP-9 observou-se que no período de 180 minutos havia maior produção desta gelatinase, período selecionado para comparação com o grupo controle.

Como mostra a figura 10, a *L. braziliensis* aumentou significativamente a produção de MMP-9 nos neutrófilos de pacientes com LC $13,4 \times 10^4$ pg/ml ($5,3 \times 10^4$ - $25,3 \times 10^4$) versus $20,1 \times 10^4$ pg/ml ($15,5 \times 10^4$ - $25,5 \times 10^4$), $***p < 0.001$. A mesma figura mostra que o mesmo ocorreu com os neutrófilos de controles sadios, $10,95 \times 10^4$ pg/ml ($5,7 \times 10^4$ - $23,3 \times 10^4$) versus $20,4 \times 10^4$ pg/ml ($7,8 \times 10^4$ - $22,3 \times 10^4$), $**p < 0.01$. No entanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando foram comparados pelo teste estatístico de Mann Whitney (figura 10).

Juntos, estes dados mostram que a *L. braziliensis* é capaz de aumentar tanto a produção de MMP-9 pelos neutrófilos de pacientes com LC quanto pelos neutrófilos de controles sadios.

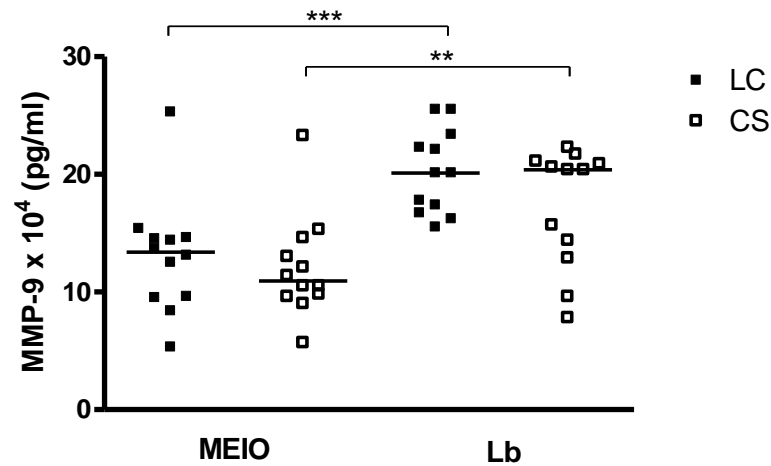


Figura 10: Produção de MMP-9 pelos neutrófilos de pacientes com LC após 180 minutos de infecção com *L. braziliensis*. Produção de MMP-9 pelos neutrófilos de pacientes com LC e de controles sadios após interação com *L. braziliensis*. A produção foi avaliada através da técnica de ELISA. O teste estatístico utilizado para comparações dentro do mesmo grupo foi o teste de Wilcoxon e os valores estão expressos em mediana, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Para comparações entre os dois grupos o teste estatístico de Mann Whitney foi utilizado e os valores estão expressos em mediana.

7.8 Produção de CCL4 pelos Neutrófilos de Pacientes com LC após Infecção *in vitro* com *L. braziliensis*

Para a dosagem de CCL4 foram utilizados os sobrenadantes das culturas de neutrófilos submetidos à interação com *L. braziliensis*, colhidos em diferentes períodos de tempo (10, 90 e 180 minutos).

O resultado apresentado refere-se aos valores obtidos no período de 180 minutos, no qual foi detectado maior produção de quimiocinas.

Como apresentando na figura 11, a produção de CCL4 por neutrófilos de pacientes com LC bem como pelos de controles sadios foi, em sua maior parte, abaixo dos níveis de detecção, e para os valores maiores não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

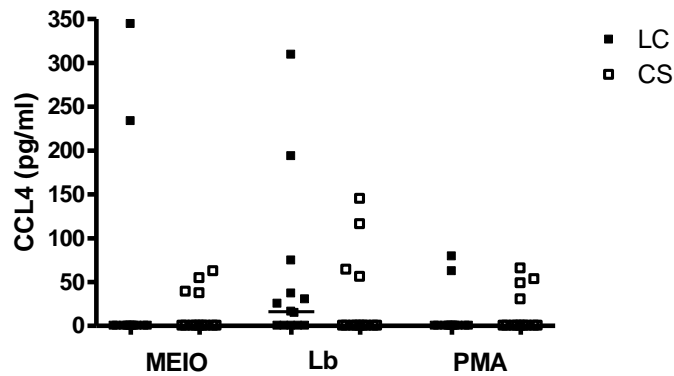


Figura 11: Produção de CCL4 dos neutrófilos de pacientes com LC após 180 minutos de infecção com *L. braziliensis*. A Produção de CCL4 foi avaliada no sobrenadante de cultura de neutrófilos de pacientes com LC e de CS após interação com *L. braziliensis* ou estímulo com PMA. A produção de CCL4 foi quantificada através da técnica de ELISA. Os valores estão expressos em mediana e o teste estatístico utilizado para análise foi o teste de Mann Whitney.

7.9 Produção de Quimiocinas do Tipo Th1 pelos Neutrófilos de Pacientes com LC

As quimiocinas CXCL9 e CXCL10 são induzidas pela produção de IFN- γ , e têm, portanto, sua síntese associada à atividade desta citocina. Estas quimiocinas atuam no recrutamento de células T para o sítio de infecção (MIKHAK et al., 2006). Como as células do tipo Th1 e a produção de IFN- γ estão relacionadas com o desenvolvimento da leishmaniose tegumentar e a formação das lesões cutâneas, foi realizada a dosagem destas quimiocinas.

Como apresentado na figura 12A, em todos os períodos de tempo observados (10, 90 e 180 minutos), os neutrófilos de pacientes com LC produziram mais CXCL9 após infecção com *L. braziliensis* do que no estado sem estímulo, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

A figura 12B mostra que os neutrófilos de pacientes com LC produziram maior concentração de CXCL9 231pg/ml(0-5629) em relação aos neutrófilos de controles sadios 26,8pg/ml(0-126,3) após a infecção com *L. braziliensis*,** $p < 0.01$.

Como apresentado na figura 13A, após apenas 10 minutos a *L. braziliensis* favoreceu o aumento da concentração de CXCL10 produzida pelos neutrófilos de pacientes com LC em relação aos neutrófilos não estimulados, 19,2pg/ml(3,8-34,6) versus 26,9pg/ml(11,5-429,2), ** $p < 0.01$. No entanto, no período de 180 minutos houve maior produção de CXCL10 pelos neutrófilos de pacientes infectados com o parasito do que no período de 10 minutos, 26,9pg/ml(11,5-429,2) versus 26,1pg/ml(8,9-236,8), * $p < 0.05$. Quando a produção de CXCL10 após 180 minutos de infecção foi comparada entre os grupos LC e CS, não houve diferença estatisticamente significativa (figura 13B).

Estes dados mostram que os neutrófilos de pacientes com LC produzem maiores concentrações de CXCL9 após a infecção com *L. braziliensis* quando comparados com os neutrófilos de controles sadios e que a *L. braziliensis* é capaz de aumentar a produção de CXCL10 por neutrófilos de pacientes com LC bem como por neutrófilos de controles sadios.

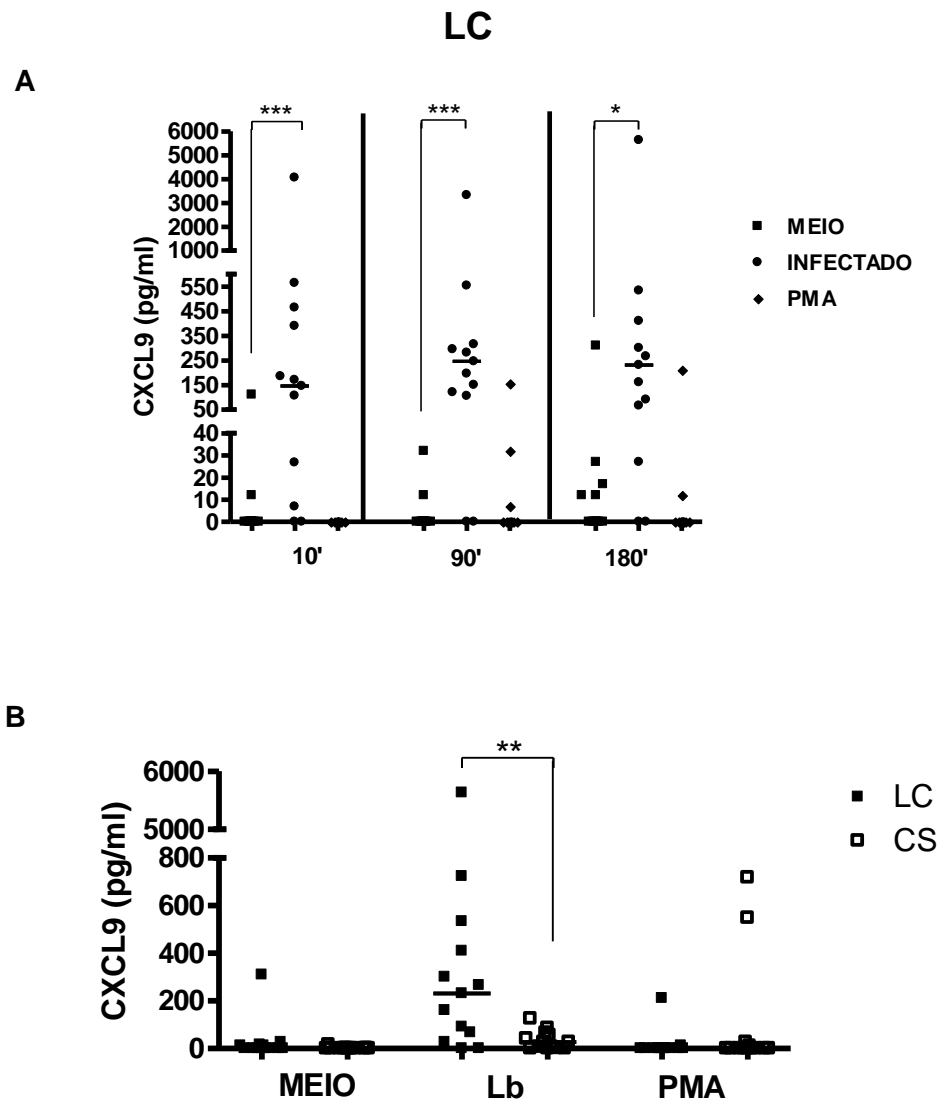


Figura 12: Produção de CXCL9 por neutrófilos de pacientes com LC após a infecção com *L. braziliensis*. O sobrenadante das culturas de neutrófilos de pacientes com LC e de controles sadios submetidos ao contato com *L. braziliensis* ou estimulados com PMA foram colhidos e a produção de CXCL9 foi quantificada através do ELISA. (A) Cinética da produção de CXCL9 por neutrófilos de pacientes com LC após 10, 90 e 180 minutos em contato com *L. braziliensis* (Lb) ou estímulo com PMA (PMA). (B) Produção de CXCL9 pelos neutrófilos de pacientes com LC e de controles sadios após 180 minutos de infecção *in vitro* ou estímulo com PMA. Todos os valores estão expressos em mediana e os testes estatísticos utilizados para a comparação entre os grupos foi o teste de Mann Whitney, enquanto o teste de Wilcoxon foi utilizado na comparação dos valores produzidos pelo mesmo indivíduo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

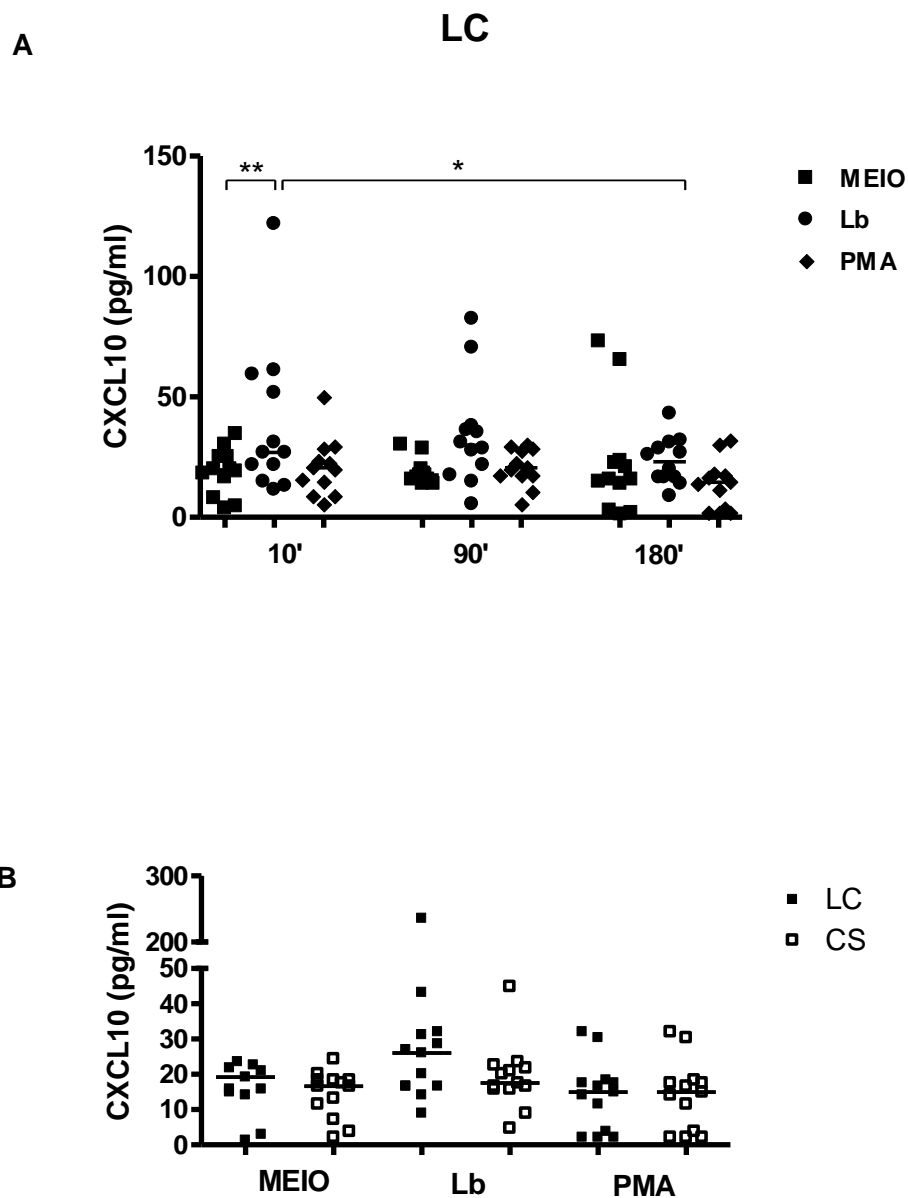


Figura 13: Produção de CXCL10 por neutrófilos de pacientes com LC após a infecção com *L. braziliensis*. O sobrenadante das culturas de neutrófilos de pacientes com LC e de controles sadios submetidos ao contato com *L. braziliensis* ou estimulados com PMA foram colhidos e a produção de CXCL10 foi quantificada através do ELISA. (A) Cinética da produção de CXCL10 por neutrófilos de pacientes com LC após 10, 90 e 180 minutos em contato com *L. braziliensis* (Lb) ou estímulo com PMA (PMA). (B) Produção de CXCL10 por neutrófilos de pacientes com LC e de controles sadios 180 minutos após contato com o parasito (Lb) ou estímulo com PMA (PMA). Todos os valores estão

expressos em mediana e os testes estatísticos utilizados para a comparação entre os grupos foi o teste de Mann Whitney, enquanto o teste de Wilcoxon foi utilizado na comparação dos valores produzidos pelo mesmo indivíduo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

8 DISCUSSÃO

Considerando que a resposta imune na leishmaniose cutânea humana, comporta-se de maneira diferente do observado no modelo murino no qual a dicotomia Th1 versus Th2 resulta na resistência ou susceptibilidade à infecção (MOSMANN et al., 1986), e que no caso da leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* a resposta Th1 está envolvida no desenvolvimento da lesão, nesse estudo nós investigamos o papel dos neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea frente à infecção *in vitro* com *L. braziliensis*.

Neste estudo foi demonstrado que neutrófilos de pacientes com LC apresentam maior produção de *burst* oxidativo do que os neutrófilos de controles sadios após a infecção *in vitro* com *L. braziliensis*, no entanto esse forte *burst* oxidativo não foi capaz de controlar a replicação do parasito no interior das células. Além disso, este estudo demonstrou que os neutrófilos podem participar da patogênese da leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis* ao criar um ambiente propício para o recrutamento de células do tipo Th1 envolvidas com a progressão da doença.

Estudos com modelo experimental de leishmaniose já indicava a possível contribuição dos neutrófilos na fase inicial da resposta imune contra a *Leishmania*, atuando no controle da infecção ou estabelecimento da doença, de acordo com o perfil de resposta do hospedeiro e a espécie do parasito (LIMA et al., 1998; TACCHINNI-COTTIER et al., 2000; RIBEIRO-GOMES et al., 2004; CHEN et al., 2005; SOUSA et al., 2014)

Os nossos dados mostraram que no período de 180 minutos após contato com *L. braziliensis* os neutrófilos de pacientes com LC são mais infectados do que os neutrófilos de controles sadios, porém não há diferença entre a carga parasitária nas células dos dois grupos.

Após a observação que a *L. braziliensis* é capaz de infectar um grande número de neutrófilos tanto de pacientes com LC quanto de indivíduos sadios, nós avaliamos se a infecção por este parasito induzia um perfil de ativação característico nos neutrófilos de paciente com leishmaniose cutânea, já que a literatura mostra que

os neutrófilos apresentam diferentes fenótipos de ativação após infecção com *Leishmania*, que varia de acordo com o perfil de resposta do hospedeiro (CHARMOY et al., 2007).

O perfil de ativação dos neutrófilos pode ser avaliado através do aumento da expressão de CD66b e redução da expressão de CD62L (BEZERRA et al., 2011; LAUFS et al., 2002). Então, para investigar se a infecção com *L. braziliensis* induzia um perfil de ativação nos neutrófilos, a expressão de CD66b e CD62L foi avaliada neste estudo.

Os resultados obtidos mostraram que após a infecção ou contato com a *L. braziliensis*, a expressão de CD66b aumentou tanto nos neutrófilos de pacientes com LC quanto nos de controles sadios. Este dado indica que a *L. braziliensis* é capaz de promover a ativação dos neutrófilos, uma vez que a molécula CD66b está armazenada nos grânulos específicos (revisado por FAURSCHOU E BORREGAARD, 2003), e sua expressão aumentada está relacionada à degranulação destas células. Este resultado está de acordo com a literatura, que mostrou que em neutrófilos de indivíduos saudáveis outra espécie do parasito, *L. major*, induz o aumento da expressão de CD66b nessas células (LAUFS et al., 2002).

O aumento na expressão de CD66b após a infecção ocorreu também nos neutrófilos *bystander*, aqueles que tiveram contato com o parasito mas não o internalizou, mostrando que apenas o contato com a *L. braziliensis*, sem a fagocitose do parasito induz a ativação e a degranulação dessas células.

Ao comparar a expressão de CD66b em neutrófilos de pacientes e de controles sadios após a infecção foi notada uma maior expressão dessa molécula nos neutrófilos de controles sadios do que nos de pacientes, mostrando que os neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea apresentam perfil menos ativado em relação ao grupo controle.

Quanto à L-selectina ou CD62L, os resultados obtidos mostraram que não houve redução na frequência nos neutrófilos de pacientes expressando essa molécula após a infecção com *L. braziliensis*. Esse dado contrapõe aos estudos que

mostram que os parasitos do gênero *Leishmania* promovem a ativação dos neutrófilos demonstrada pela redução de células expressando CD62L (LAUFS et al., 2002; BEZERRA et al., 2011).

No entanto, a redução na frequência de CD62L não indica apenas ativação dos neutrófilos, mas também migração destas células para o sítio de infecção (HAFEZI-MOGHADAN et al., 2001; VON ADRIAN et al., 1993). Dessa forma, os nossos resultados podem indicar também que possivelmente, os neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea tenham menor capacidade de migração para o sítio de infecção, ou migrem mais lentamente, visto que a perda de CD62L está também associada com a velocidade de migração dos neutrófilos. (HAFEZI-MOGHADAN et al., 2001). Este dado de alguma forma fortalece outros estudos que mostram que o infiltrado inflamatório nas lesões de pacientes com LC é constituído por diversos tipos celulares como macrófagos, linfócitos e plasmócitos, mas não por neutrófilos (BITTENCOURT & BARRAL, 1991; MENDES et al., 2013; DANTAS et al., 2013).

Quanto às diferenças observadas na expressão dos diferentes marcadores de superfície avaliados, alguns estudos demonstram a existência de diferentes subclasses de neutrófilos através de variações na expressão dessas moléculas (PILLAY et al., 2012; DE KLEIJN et al., 2013), na diferença de produção de citocinas e na expressão de receptores do tipo Toll (TSUDA et al., 2004). Um dos marcadores utilizados para a caracterização dessas subclasses de neutrófilos é o CD62L, o qual demonstra a maturidade destas células através da redução na sua expressão enquanto sua alta expressão está relacionada à imaturidade (PILLAY et al., 2012; de DE KLEIJN et al., 2013). Os resultados observados neste estudo sugerem que a população de neutrófilos de pacientes com LC com alta expressão de CD62L apresentam um perfil imaturo que denota menor capacidade migratória ou recrutamento recente.

A molécula CD11b, além de compor o receptor CR3 que é necessário para o reconhecimento e internalização de formas promastigotas da *Leishmania* (MOSSER & EDELSON, 1985; LAUFS et al., 2002), é também essencial para a transmigração eficiente dos neutrófilos (TULL et al., 2009; KINHULT et al., 2003).

Também foi observado que após a infecção com *L. braziliensis* ou estímulo com PMA houve redução na expressão de CD11b nos neutrófilos de ambos os grupos quando comparada com a expressão em células não estimuladas. Como a expressão de CD11b foi avaliada na superfície através da marcação com anticorpos, esse resultado sugere que estando os neutrófilos com um perfil já ativado em estado basal, após a infecção ou estímulo, o CD11b expresso na superfície dessas células foi exocitado para o meio, não podendo ter sido detectado através da marcação de superfície. Esta explicação está de acordo com o dado que mostrou que a expressão de CD66b aumentou significativamente após a infecção ou estímulo com PMA nos neutrófilos dos pacientes e dos controles sadios. O CD66b está armazenado nos grânulos específicos ou secundários, grânulos com menor tendência a serem exocitados do que os secretórios, onde está armazenado o CR3 (CD11b/CD18), então, nesse período de 90 minutos após estímulo ou infecção, no qual foi avaliada a expressão dessas duas moléculas, a ativação dos neutrófilos foi intensa a ponto de ocorrer a ativação dos grânulos específicos e liberação de grande parte das moléculas CD11b dos grânulos secretórios. Possivelmente em um período mais inicial da infecção a expressão de CD11b na superfície dos neutrófilos poderia ter sido detectada.

Após a avaliação fenotípica dos neutrófilos pela expressão dos referidos marcadores de superfície, nós avaliamos a ativação dos mecanismos microbicidas destas células através da produção do *burst* oxidativo. Os resultados mostraram que os neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea já apresentavam maior produção de *burst* oxidativo em relação aos neutrófilos de controles sadios mesmo em estado basal.

Assim como outras espécies de *Leishmania* são capazes de induzir ou potencializar o *burst* oxidativo nos neutrófilos (LAUFS et al., 2002; CARLSEN et al., 2013), a *L. braziliensis* promoveu o aumento na produção do *burst* nos neutrófilos tanto de pacientes com LC quanto dos controles sadios, entretanto, houve maior produção pelos neutrófilos de pacientes do que pelos neutrófilos do grupo controle.

Como o *burst* oxidativo é capaz de atuar no controle inicial da infecção, foi necessário investigar se essa alta produção de radicais reativos formados na explosão respiratória estava controlando a replicação do parasito.

A *Leishmania* é capaz de evadir os mecanismos microbicidas dos fagócitos, podendo sobreviver e replicar-se a ponto de romper as células e serem liberadas para o meio extracelular onde buscarão novos alvos para infectar, por isso a viabilidade dos parasitos extracelulares foi avaliada após 24 horas de cultura com os neutrófilos de pacientes com LC e controles saudáveis.

Os dados apresentados neste estudo mostraram que na cultura de neutrófilos de ambos os grupos havia parasitos viáveis após 24 horas e o número de parasitos foi significativamente maior em relação ao período inicial de avaliação. No entanto, ao comparar-se o número de parasitos viáveis entre os grupos, não houve diferença. Esses resultados sugerem que a *L. braziliensis* é capaz de replicar no interior dos neutrófilos de pacientes e controles de tal maneira que provoca o rompimento destas células.

Ainda com a finalidade de confirmar se a *L. braziliensis* podia replicar no interior dos neutrófilos, suas formas promastigotas foram coradas com CFSE, corante utilizada para análise de proliferação (MESSARITAKIS et al., 2010), e a proliferação da *L. braziliensis* nos neutrófilos de pacientes com LC, em diferentes períodos de tempo, foi acompanhada através da citometria de fluxo.

Como apresentado, embora não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de expressão de CFSE nos diferentes pontos de infecção, foi demonstrada a redução na fluorescência desse marcador após o ponto inicial, sugerindo que a *L. braziliensis* estava replicando no interior dos neutrófilos dos pacientes com leishmaniose cutânea e que o forte *burst* oxidativo induzido pelas células destes pacientes não foi eficaz na morte do parasito.

Como o forte *burst* oxidativo não estava associado com o controle da replicação do parasito, a resposta inflamatória exacerbada produzida pelos neutrófilos poderia estar associada com a formação das lesões, então foi realizado um teste de correlação entre a expressão de dihidrorodamina pelos neutrófilos de

pacientes com leishmaniose cutânea e o tamanho das lesões, mas não foi encontrada correlação entre os parâmetros (dado não apresentado).

Alguns estudos também têm demonstrado que a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) está associada à resposta inflamatória exacerbada em algumas infecções, como por exemplo a infecção pelo vírus *Influenza*, promovendo a migração excessiva dos neutrófilos para o trato respiratório (BRADLEY et al., 2012) e também à patogênese da leishmaniose mucosa. No infiltrado das lesões de pacientes com leishmaniose mucosa, foi observada uma alta concentração de MMP-9 (BOAVENTURA et al., 2010) assim como nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea, baixo respondedores ao tratamento com o antimonial (MARETTI-MIRA et al., 2011a). A infecção por *L. braziliensis* aumenta a atividade dessa enzima em macrófagos humanos de controles sadios (MARETTI-MIRA et al., 2011b).

Como os neutrófilos são as principais células produtoras da MMP-9, nós avaliamos a influência da infecção com *L. braziliensis* na produção dessa molécula por neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea. Os resultados obtidos mostram que a *L. braziliensis* é capaz de aumentar a produção de MMP-9 por essas células. Quando a produção de MMP-9 pelos neutrófilos foi comparada entre os dois grupos avaliados, não foi observada diferença estatisticamente significativa, demonstrando que a *L. braziliensis* pode induzir a atividade da MMP-9 tanto nos neutrófilos de pacientes quanto nos de controles sadios.

Ainda assim, nós investigamos se a produção de MMP-9 pelos neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea estava associada com o tamanho das lesões, no entanto não foi observada correlação entre os parâmetros analisados (dado não mostrado).

Os neutrófilos não apenas podem atuar no controle inicial da infecção através da ativação dos seus mecanismos microbicidas como também são capazes de recrutar células efetoras para o sítio da infecção através da produção e secreção de citocinas e quimiocinas (revisado por MANTOVANI et al., 2011).

A quimiocina CCL3 produzida pelos neutrófilos mostrou ser importante no recrutamento de células dendríticas para o sítio de infecção por *L. major* em modelo

murino (CHARMOY, 2010), enquanto a produção de CCL4 pelos neutrófilos está associada ao recrutamento dos monócitos para o sítio de infecção (LASKAY et al., 2008). A produção dessas citocinas foi avaliada neste estudo, no entanto a concentração de CCL3 produzida pelos neutrófilos de pacientes com LC e de controles sadios estava abaixo do nível de detecção do teste (dado não apresentado).

Quanto à produção de CCL4 pelos neutrófilos de pacientes, a concentração desta quimiocina só se mostrou expressiva no período de 180 minutos após a infecção com *L. braziliensis*, por isso os valores encontrados no grupo LC nesse período foram comparados com os do grupo CS, mas não foi observada diferença estatisticamente significativa até porque a produção de CCL4 em ambos os grupos mostrou-se bastante heterogênea, e na maioria dos indivíduos avaliados a concentração dessa quimiocina estava abaixo do nível de detecção.

Considerando que a patogênese da leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis* envolve uma resposta inflamatória exacerbada do tipo Th1, com alta produção de TNF- α e IFN- γ que são responsáveis pelo controle da replicação do parasito, mas estão associadas com a formação das lesões teciduais (ANTONELLI et al., 2005; BACELLAR et al., 2002), as células T estão diretamente relacionadas com a progressão da leishmaniose tegumentar. Dessa forma, foi importante investigar a contribuição dos neutrófilos para o recrutamento das células T, avaliando a produção das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 por esses granulócitos.

Contrariamente ao estudo que demonstrou que a *L. major* inibiu a produção de CXCL10 pelos neutrófilos após infecção (VAN ZANDBERGEN et al., 2002), neste estudo foi demonstrado que a *L. braziliensis* provocou o aumento na produção de CXCL10 pelos neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea. Todavia, não foi observada diferença significativa na produção de CXCL10 entre os dois grupos avaliados.

Nos três períodos de infecção avaliados, houve uma maior produção de CXCL9 pelos neutrófilos de pacientes após infecção *in vitro* com *L. braziliensis* em relação aos neutrófilos não estimulados. Quando a produção de CXCL9 foi

comparada entre os grupos LC e CS no período de maior produção desta quimiocina, observou-se que os neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea produziram mais CXCL9 do que os neutrófilos dos controles sadios após a infecção com *L. braziliensis*. A produção dessa quimiocina está envolvida na patogênese e severidade de várias doenças inflamatórias como a malária grave e esclerose múltipla (MAHAD et al., 2002; AYIMBA et al., 2011). Recentemente, foi documentado que macrófagos de pacientes com leishmaniose cutânea apresentam maior produção de CXCL9 em relação aos macrófagos de indivíduos sadios (GIUDICE et al., 2012) e de indivíduos com infecção subclínica mostrando que essa quimiocina pode participar da patogênese da leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.

Os achados do nosso estudo indicam que, assim como os macrófagos, os neutrófilos podem contribuir para forte resposta inflamatória observada nessa doença.

9 SUMÁRIO DE RESULTADOS

1. Neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea são mais infectados do que os neutrófilos de controles sadios após 180 minutos de contato com *L. braziliensis*.

2. *Leishmania braziliensis* aumenta a expressão de CD66b nos neutrófilos de pacientes com LC e nos de controles sadios, mas a expressão dessa molécula é maior nos controles sadios em relação ao primeiro grupo.

3. Neutrófilos de pacientes com LC e de controles sadios que tiveram contato com a *L. braziliensis* mas que não a internalizou também apresentaram maior expressão de CD66b.

4. Não foi observada redução na frequência de neutrófilos de pacientes com LC expressando CD62L após a infecção com *L. braziliensis*, em contraste ao que foi visto nos neutrófilos de controles sadios.

5. Após a infecção com *L. braziliensis* houve uma redução na expressão de CD11b na superfície dos neutrófilos dos dois grupos avaliados.

6. Neutrófilos de pacientes com LC produziram mais *burst* oxidativo do que os neutrófilos do grupo CS após a infecção.

7. Neutrófilos de pacientes com LC produzem mais CXCL9 após a infecção com *L. braziliensis* quando comparado ao grupo controle.

10 CONCLUSÃO

Nossos dados demonstraram, pela primeira vez, que os neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea apresentam um perfil de ativação diferente dos neutrófilos de controles sadios. Adicionalmente, esses dados sugerem que os neutrófilos podem contribuir com a patogênese da doença através do recrutamento e ativação das células Th1 em resposta à produção de CXCL9.

11 FUTURAS DIREÇÕES

Como os resultados desse estudo sugerem que os neutrófilos de pacientes com leishmaniose cutânea podem participar da patogênese da doença e, outros estudos mostram que indivíduos com infecção subclínica são capazes de controlar a infecção por *L. braziliensis* através de um mecanismo ainda não esclarecido, nosso objetivo futuro é investigar qual a participação dos neutrófilos no controle da infecção nesses indivíduos.

Para obtermos esta resposta, buscaremos cumprir cinco objetivos específicos.

1- Comparar a capacidade de infecção e multiplicação de *L. braziliensis* em neutrófilos de indivíduos SC e de pacientes com LC após infecção *in vitro*.

2- Avaliar a expressão de marcadores de ativação (CD62L, CD66b e CD11b) e de diferentes receptores tipo Toll (TLRs 2, 4 e 9) em neutrófilos infectados com *L. braziliensis* em ambos os grupos.

3- Avaliar o papel dos radicais reativos do oxigênio (ROS) e do óxido nítrico (NO) no controle da infecção por *L. braziliensis* em neutrófilos de indivíduos subclínicos e de pacientes com LC.

4- Determinar a produção de citocinas (TNF- α , IL-10 e IL-12) e quimiocinas (CCL3, CCL4, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) por células de indivíduos subclínicos após infecção com *L. braziliensis*.

5- Avaliar a interação de neutrófilos viáveis ou apoptóticos com macrófagos autólogos infectados com *L. braziliensis* de indivíduos saudáveis e de pacientes com LC.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, Clarêncio J, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol*. Aug;84(2):389-96. 2008.
- Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, Solbach W, Laskay T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. Jul 15;169(2):898-905. 2002.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*.;7(5):e35671. 2012.
- Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett*. Nov 15;101(2):226-30. 2005.
- Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agossou A, Banla M, Soboslay PT. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol*. Nov;166(2):218-26. 2011.
- Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. Dec;70(12):6734-40. 2002.
- Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol*. Aug;52(2):135-42. 1992.

- Bezerra CA, Cardoso TM, Giudice A, Porto AF, Santos SB, Carvalho EM, Bacellar O. Evaluation of the microbicidal activity and cytokines/chemokines profile released by neutrophils from HTLV-1-infected individuals. *Scand J Immunol*. Sep;74(3):310-7. 2011.
- Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Jan-Mar;86(1):51-6. 1991.
- Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, de Andrade J, Dos Santos WL, Clarêncio J, Silva JS, Borges VM, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Barral A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol*. Oct;40(10):2830-6. 2010.
- Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*. Feb;173:17-26. 2000.
- Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. Nov;84(2):188-94. 1996.
- Bradley LM, Douglass MF, Chatterjee D, Akira S, Baaten BJ. Matrix metalloprotease 9 mediates neutrophil migration into the airways in response to *Influenza* virus-induced toll-like receptor signaling. *PLoS Pathog*. 8(4):e1002641. 2012.
- Carlsen ED, Hay C, Henard CA, Popov V, Garg NJ, Soong L. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infect Immun*. Nov;81(11):3966-74. 2013.

- Carvalho EM, Bacellar OA, Reed S, Barral A, Rocha H. Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania. *Braz J Med Biol Res.*;21(1):85-92. 1988.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* Apr;56(4):315-25. 1994.
- Chang KP. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg.* Mar;30(2):322-33. 1981.
- Charmoy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, Auderset F, Launois P, Milon G, Proudfoot AE, Tacchini-Cottier F. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.* Feb 5;6(2):e1000755. 2010.
- Charmoy M, Megnekou R, Allenbach C, Zweifel C, Perez C, Monnat K, Breton M, Ronet C, Launois P, Tacchini-Cottier F. *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol.* Aug;82(2):288-99. 2007.
- Chen L, Zhang ZH, Watanabe T, Yamashita T, Kobayakawa T, Kaneko A, Fujiwara H, Sendo F. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int.* Jun;54(2):109-18. 2005.
- Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg.* Mar;50(3):296-311. 1994.

- Dantas ML, Oliveira JC, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Machado P, Carvalho E, Arruda S. CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. Nov-Dec;46(6):728-34. 2013.
- de Kleijn S, Langereis JD, Leentjens J, Kox M, Netea MG, Koenderman L, Ferwerda G, Pickkers P, Hermans PW. IFN- γ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *PLoS One*. Aug 28;8(8):e72249. 2013.
- de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*. Sep;73(9):5827-34. 2005.
- Dinauer MC, Lekstrom-Himes JA, Dale DC. Inherited Neutrophil Disorders: Molecular Basis and New Therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 303-318. 2000.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. Nov;5(14):1317-27. 2003.
- Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis*. Jun 1;34(11):E54-8. 2002.
- Fortunati E, Kazemier KM, Grutters JC, Koenderman L, Van den Bosch vJ. Human neutrophils switch to an activated phenotype after homing to the lung irrespective of inflammatory disease. *Clin Exp Immunol*. Mar;155(3):559-66. 2009.
- Gamaletsou MN, Rammaert B, Bueno MA, Moriyama B, Sipsas NV, Kontoyiannis DP, Roilides E, Zeller V, Prinapori R, Taj-Aldeen SJ, Brause B, Lortholary O,

- Walsh TJ. Aspergillus osteomyelitis: Epidemiology, clinical manifestations, management, and outcome. *J Infect.* Dec 27. pii: S0163-4453(13)00384-8. 2013.
- Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. *BMC Infect Dis.* Mar29;12:75. 2012.
- Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* Dec;41(6):687-725. 1989.
- Gueirard P, Laplante A, Rondeau C, Milon G, Desjardins M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol.* Jan;10(1):100-11. 2008.
- Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceição-Silva F, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 21;106(16):6748-53. 2009.
- Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Prorock AJ, Huo Y, Ley K. L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J Exp Med.* Apr 2;193(7):863-72. 2001.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* Nov 1;92(9):3007-17. 1998.
- Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary

leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg.* Mar;86(3):426-33. 2012.

Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca TF, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis.* Jul;156(1):73-83. 1987.

Kinhult J, Egesten A, Benson M, Uddman R, Cardell LO. Increased expression of surface activation markers on neutrophils following migration into the nasal lumen. *Clin Exp Allergy.* Aug;33(8):1141-6. 2003.

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology.* 213(3-4):183-91. 2008.

Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun.* Feb;70(2):826-35. 2002.

Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg.* Aug;65(2):87-9. 2001.

Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz J Otorhinolaryngol.* Nov-Dec;73(6):843-7. 2007.

Liew FY, Cox FE. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today.* Mar;12(3):A17-21. 1991.

- Lima GM, Vallochi AL, Silva UR, Bevilacqua EM, Kiffer MM, Abrahamsohn IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett.* Dec;64(2-3):145-51. 1998.
- Machado PR, Lessa H, Lessa M, Guimarães LH, Bang H, Ho JL, Carvalho EM. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, Mar 15;44(6):788-93. 2007.
- Mahad DJ, Howell SJ, Woodroffe MN. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* Apr;72(4):498-502. 2002.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* Jul 25;11(8):519-31. 2011.
- Maretti-Mira AC, de Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, de Oliveira MP, Craft N, Pirmez C. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* Feb;163(2):207-14. 2011a.
- Maretti-Mira AC, de Pinho Rodrigues KM, de Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Craft N. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Trop.* Aug;119(2-3):160-4. 2011b.
- Marsden PD. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Parasitol Today.* Nov;1(5):129-33. 1985.
- McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, Heesemann J, Ebel F. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* Nov;12(12-13):928-36. 2010.

- Mendes DS, Dantas ML, Gomes JM, Santos WL, Silva AQ, Guimarães LH, Machado PR, Carvalho EM, Arruda S. Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4+, CD20+, CD68+, CD31+ and vW+ cells in non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Feb;108(1):18-22. 2013.
- Messaritakis I, Mazeris A, Koutala E, Antoniou M. *Leishmania donovani* s.l.: evaluation of the proliferation potential of promastigotes using CFSE staining and flow cytometry. *Exp Parasitol*. Aug;125(4):384-8. 2010
- Mikhak Z, Fleming CM, Medoff BD, Thomas SY, Tager AM, Campanella GS, Luster AD. STAT1 in peripheral tissue differentially regulates homing of antigen-specific Th1 and Th2 cells. *J Immunol*. Apr 15;176(8):4959-67. 2006.
- Ministério da Saúde/SVS/Sinan. Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2012 Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Nov/22/LTA_Coef_Deteccao.pdf> Acesso em: 06 de dezembro de 2013
- Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Goncalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Netto M, Barral A. Frequency of infection of *Lutzomyia* phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Mar;97(2):185-8. 2002.
- Mollinedo F, Janssen H, de la Iglesia-Vicente J, Villa-Pulgarin JA, Calafat J. Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. *J Biol Chem*. Nov 5;285(45):34528-36. 2010
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 2005 Jul 1;175(1):5-14. 1986.

- Mosser DM, Edelson PJ. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol.* Oct; 135(4):2785-9. 1985.
- Müller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W, Laskay T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol.* Nov;190(1-2):73-6. 2001.
- Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J Clin Invest.* Oct;72(4):1506-10. 1983.
- Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, de Oliveira CI. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol.* Dec 15;183(12):8088-98. 2009.
- Novoa R, Bacellar O, Nascimento M, Cardoso TM, Ramasawmy R, Oliveira WN, Schriefer A, Carvalho EM. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. *Parasite Immunol.* Feb;33(2):132-6. 2011.
- Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* Oct;127(4):1438-43. 1981.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* Aug 15;321(5891):970-4. 2008.

- Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol.* Jul;6(7):541-50. 2006.
- Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, Ulfman LH, Leenen LP, Pickkers P, Koenderman L. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest.* Jan 3;122(1):327-36. 2012.
- Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* Jan;31(1):143-8. 1998.
- Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, DosReis GA. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* Apr 1;172(7):4454-62. 2004.
- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* Nov;2(11):845-58. 2002.
- Schnorr D, Muniz AC, Passos S, Guimaraes LH, Lago EL, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM. IFN- γ production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(12):e1947. 2012.
- Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.*;23:197-223. 2005.
- Skubitz KM, Skubitz AP. Two new synthetic peptides from the N-domain of CEACAM1 (CD66a) stimulate neutrophil adhesion to endothelial cells. *Biopolymers.* 96(1):25-31. 2011.

- Sousa LM, Carneiro MB, Resende ME, Martins LS, Dos Santos LM, Vaz LG, Mello PS, Mosser DM, Oliveira MA, Vieira LQ. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* Jan;36(1):13-31. 2014.
- Stocks SC, Kerr MA, Haslett C, Dransfield I. CD66-dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin-mediated regulation of neutrophil adhesion. *J Leukoc Biol.* Jul;58(1):40-8. 1995.
- Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, Milon G, Louis JA. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol.* Sep 1;165(5):2628-36. 2000
- Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity.* Aug;21(2):215-26. 2004.
- Tull SP, Yates CM, Maskrey BH, O'Donnell VB, Madden J, Grimble RF, Calder PC, Nash GB, Rainger GE. Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. *PLoS Biol.* Aug; 7(8):e1000177. 2009.
- Uriarte SM, Rane MJ, Luerman GC, Barati MT, Ward RA, Nauseef WM, McLeish KR. Granule exocytosis contributes to priming and activation of the human neutrophil respiratory burst. *J Immunol.* Jul 1;187(1):391-400. 2011.
- van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10

production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun.* Aug;70(8):4177-84. 2002.

van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* Dec 1;173(11):6521-5. 2004.

Venturi GM, Tu L, Kadono T, Khan AI, Fujimoto Y, Oshel P, Bock CB, Miller AS, Albrecht RM, Kubes P, Steeber DA, Tedder TF. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity.* Nov;19(5):713-24. 2003.

Vethanayagam RR, Almyroudis NG, Grimm MJ, Lewandowski DC, Pham CT, Blackwell TS, Petraitiene R, Petraitis V, Walsh TJ, Urban CF, Segal BH. Role of NADPH oxidase versus neutrophil proteases in antimicrobial host defense. *PLoS One.*6(12):e28149. 2011.

von Andrian UH, Chambers JD, Berg EL, Michie SA, Brown DA, Karolak D, Ramezani L, Berger EM, Arfors KE, Butcher EC. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways. *Blood.* Jul 1;82(1):182-91. 1993.

13 ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Nome do Projeto: O papel dos neutrófilos na patogênese da leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania braziliensis*

Investigador Principal: Maria Olivia Amado Ramos Bacellar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

Comitê de Ética: Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/n - 1º andar, Canela CEP: 40.110-060 Salvador – Bahia- Tel: (71) 3283-8140

NOME DO PACIENTE: _____

Número de Identificação no Projeto:**Convite e Objetivo:**

Você é convidado (a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa ou se mantêm infectadas com a *leishmania* sem apresentar doença. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado (a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento caso você tenha a doença cutânea ou mucosa. Caso depois de aceitar participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose (Glucantime®) se estiver doente.

Finalidade do estudo: Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela *leishmania*. Para isto estudaremos o seu sangue, o parasito que causa a doença quando este for isolado, e caso esteja doente, também o material da ferida obtida pela retirada de um pequeno pedaço da sua pele.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, realizar biópsia da lesão caso apresente ferida na pele ou mucosa, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença. Você doará 30 a 50 ml de sangue (mais ou menos 2 colheres de sopa) para a pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo. A retirada do pedaço da pele ou da ferida do nariz para o diagnóstico da sua doença, caso necessário, será feita com anestesia para você não sentir dor e parte deste material será utilizado para os estudos da defesa do seu corpo contra a *leishmania*. Caso o diagnóstico de leishmaniose não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento e avaliação diagnóstica sua participação no estudo acabará 1 dia. Caso se constate que você tem a doença leishmaniose, todo mês você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de nova série de Glucantime® ou de outra medicação, que também lhe será fornecido gratuitamente. Isto não faz parte do estudo.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica. Você ou qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análises de riscos e benefícios: Caso esteja doente, o tratamento que você receberá (Glucantime®) é semelhante ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. Não existe nenhum procedimento adicional para os participantes do estudo, assim não existe também nenhum risco adicional para você.

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: As leishmanioses são doenças relacionadas à reação do seu organismo contra a leishmania e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose.

Custos: Você não terá custos com o tratamento com antimônio ou com outra droga para tratamento da leishmaniose caso haja necessidade de uso. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone 71- 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos e de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone: (71) 3283-8140

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue e / ou pele possam ser guardadas para pesquisa no futuro.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue e / ou pele possam ser guardadas para pesquisa no futuro.

Assinatura do participante

Data

Hora

Assinatura da testemunha

Data

Hora

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

Assinatura do pesquisador

Data

Hora

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE EM CONTROLES SADIOS

Nome do Projeto: O papel dos neutrófilos na patogênese da leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania braziliensis*

Investigador Principal: Maria Olivia Amado Ramos Bacellar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

Comitê de Ética: Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos Rua Augusto Viana, s/n - 1º andar, Canela **CEP:** 40.110-060 Salvador – Bahia- Phone: (71) 3283-8140

NOME DO PARTICIPANTE: _____

Número de Identificação no Projeto:

Convite e **Objetivo:**
Você é convidado (a) a participar como voluntário de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo aos médicos que fazem parte do projeto. Antes de concordar em participar desta pesquisa é importante que você leia este documento, e caso decida participar do estudo você será solicitado (a) a assinar este formulário de consentimento.

Participação Voluntária: A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da doença Leishmaniose Tegumentar Americana. Você é livre para recusar a participar no estudo.

Finalidade do Estudo: Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela *leishmania*. Para isto estudaremos o seu sangue.

Procedimentos: Caso concorde em participar do estudo, você doará 30 a 50 ml de sangue (mais ou menos 2 colheres de sopa) para separação das células de defesa e pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo frente à infecção por *leishmania*.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe científica. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Análises de Riscos e Benefícios: A retirada de sangue nos pacientes pode provocar dor leve devido à punção com agulha. Em casos raros se acompanha de sangramento ou mancha na pele. A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:
O entendimento de como a resposta imune contribui para o desenvolvimento da leishmaniose tegumentar trará benefícios grandes aos portadores da doença, inclusive o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Custos: Você não terá custos com a participação no estudo e nem receberá pagamento por sua participação.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone 71- 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone: (71) 3283-8140

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue possa ser guardada para pesquisa no futuro.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue possa ser guardada para pesquisa no futuro.

Assinatura do participante

Data

Hora

Assinatura da testemunha

Data

Hora

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

Assinatura do pesquisador

Data

Hora