

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Waldionê de Castro

**PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
DURANTE A INFECÇÃO POR *LEISHMANIA INFANTUM***

BELO HORIZONTE, FEVEREIRO DE 2015

Waldionê de Castro

**PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
DURANTE A INFECÇÃO POR *LEISHMANIA INFANTUM***

**Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais, como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutor em Bioquímica e Imunologia.
Área de concentração: Imunologia de
doenças infecciosas**

**Orientadora: Prof. Dr. LEDA QUERCIA
VIEIRA**

BELO HORIZONTE, FEVEREIRO DE 2015

043

Castro, Waldionê de.

Papel das espécies reativas de oxigênio durante a infecção por *Leishmania infantum* [manuscrito] / Waldionê de Castro. – 2015.
125 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dr. Leda Quercia Vieira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Leishmaniose. 3. *Leishmania infantum*. 4. Espécies Reativas de Oxigênio. I. Vieira, Leda Quercia. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



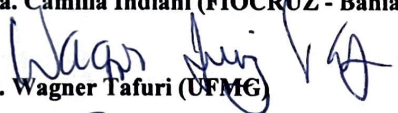
Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha
31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



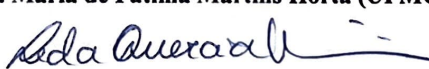
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE WALDIONÊ DE CASTRO. Aos vinte dias do mês de fevereiro de 2015 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Papel das espécies reativas de oxigênio durante a infecção por *Leishmania Infantum*", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Leda Quercia Vieira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira (Universidade Federal de Goiás), aprovado; Dra. Camilla Indiani (FIOCRUZ - Bahia), aprovado; Dr. Wagner Tafuri (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Leda Quercia Vieira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2015.

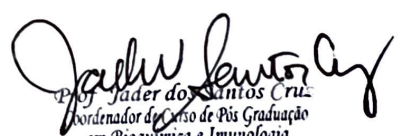

Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira (Universidade Federal de Goiás)


Dra. Camilla Indiani (FIOCRUZ - Bahia)


Dr. Wagner Tafuri (UFMG)


Dr. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG)


Dr. Leda Quercia Vieira - Orientadora (UFMG)


Prof. Jader dos Santos Cruz
Coordenador do Curso de Pós Graduação
em Bioquímica e Imunologia
ICB - UFMG

**Dedico a toda minha família,
em especial aos meus pais Waldir e Alva**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Professora Leda Q. Vieira, pelos bolos, pizzas, pães e biscoitos. Eles fazem os alunos entrarem e permanecerem no laboratório. Mas lembre-se que cada grama que eu engordei nesses anos de laboratório serão cobrados. Minha eterna gratidão por todos os conselhos e orientações, pelo apoio e incentivo, pela incansável motivação e exemplos. Serei eternamente grato a você por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Por me ajudar de todas as formas possíveis na realização do sonho de voltar a estudar, acreditando em mim e por todo carinho comigo.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG que contribuíram para minha formação.

Agradeço a Professora Maria Norma de Melo e todo o pessoal de seu laboratório, em especial a Soraia Silva, pela constante ajuda e por me receber tão bem no laboratório.

Agradeço ao Professor Wagner Tafuri e todo o pessoal de seu laboratório, em especial a Carolina Carvalho de Souza, pela parceria e colaboração nos experimentos.

Agradeço aos professores Ricardo Gonçalves, Fabiana S. Machado, Dawidson A. Gomes, Maria de F. M. Horta, Helton da C. Santiago, a Dra Denise S. L. Giunchetti pela disposição de ensinar e colaborar em meus experimentos.

Agradeço ao Dr Jesus G. Valenzuela que me deu a oportunidade de trabalhar em seu laboratório nos Estados Unidos. Sua alegria e entusiasmo são contagiante e fazem de seu laboratório o lugar ideal para fazer amizades e produzir Ciência.

Agradeço a Shaden por me receber tão bem no laboratório e por sempre estar disposta a tirar minhas dúvidas com muita sabedoria e humildade.

Aos queridos amigos Fabiano e Anderson que foram incríveis companheiros no trabalho e fora dele. Vocês contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional e pessoal com conselhos, discussões, colaborações, jantares e festas. Minha vida nos EUA foi melhor do que eu esperava e sei que vocês tem uma enorme participação nisto. Minha eterna gratidão.

Aos membros do LMVR que me acolheram com grande carinho durante o ano do doutorado sanduiche muito obrigado.

Agradeço a Antônio, Andrezza, Willy, Bruna, Lais, Bia, Vitor, Elisabeth, Katiuchia, Karina, Beto, Raquel, Kátia, José Luis, Lorena, Rafael, Norinne, Nico, Diego, Alessandra, Fernanda, Jacqueline, André, Pedro, Danilo, e todos os demais amigos que fiz nos EUA durante esse ano.

Aos meus queridos amigos do LAGI, Paulinha, Grazi, Caio, Diego, Leonardo, Mateus, Peter, João, Debora, Layara, Pierre e aos colegas da odonto, gostaria de agradecer a todos vocês pelo ambiente tão agradável, pelos momentos de alegria e de apertos nos experimentos. Sem a ajuda de vocês nenhum experimento teria acontecido. Agradeço especialmente minha ex-aluna de iniciação científica Ana Clara pela ajuda, esforço, dedicação, carinho e amizade.

Liliane e Matheus me ajudaram a encontrar vários caminhos que me levaram a ser mais consciente de mim mesmo no aspecto acadêmico. Vocês foram fundamentais em cada passo que dei neste doutorado. Colaboraram e se sacrificaram para a realização deste projeto. Acima de qualquer coisa sou grato pela amizade de vocês e é bom saber que posso contar com vocês sempre que preciso.

Obrigado a Andréa, Livia, Samara, Bárbara, Nina, Carol, Bruno e todos aqueles que sempre estão presentes e fazem do LAGI o segundo laboratório.

Agradeço meus queridos amigos Breno, Cris e Túlio que não desistiram de mim. Apesar dos meus momentos de ausência, da distância física, da falta de telefonemas, vocês se esforçaram para entender, aceitar e sempre me incentivaram nesta caminhada árdua. Vocês entenderam minhas prioridades e mantiveram sua confiança em mim e por isto sou eternamente grato.

A todos os familiares que sempre torceram para "tudo dar certo".

Ao meu irmão e sobrinhos tão amados, agradeço pelas alegrias de cada encontro, pelas palavras de incentivo e por me darem tanto amor. Adoraria que vocês entendessem que o melhor caminho na vida é através dos estudos.

Como agradecer em poucas palavras todo o amor e carinho, todo o esforço e sacrifício, toda entrega e dedicação feitos pelas pessoas que você mais ama? Aos meus amados e queridos pais, Waldir e Alva, este trabalho é totalmente dedicado a vocês. Vocês sempre me aceitaram e amaram como eu sou, sem restrições, condições e sempre com entrega total e sem questionamentos. Obrigado por acreditarem em mim e por me ensinarem através de seus exemplos a ser uma pessoa melhor. Espero conseguir retribuir toda esta dedicação. Amo vocês.

RESUMO

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são um grupo de íons, radicais e moléculas contendo oxigênio reativo. Elas participam de vários processos biológicos desde biossíntese hormonal, sinalização celular, indução de morte celular por apoptose e eliminação de patógenos microbianos intracelulares. São produzidos por fagócitos quando apropriadamente estimulados. A enzima NADPH oxidase é responsável pela conversão de O_2 em $O_2^{\cdot-}$ utilizando como doador de elétron o NADPH. Estudos demonstraram diferentes efeitos da ação de ROS em infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. Assim, no presente trabalho determinamos as diferentes espécies de oxigênio geradas por macrófagos quando infectados *in vitro* por *Leishmania infantum*. Além disso, avaliamos a influência da produção destes radicais no infiltrado celular nos estágios iniciais da infecção *in vivo* intradérmica por esse parasito. Nossos dados demonstram que na infecção de macrófagos por estes parasitos há a explosão respiratória, caracterizada pela produção de $O_2^{\cdot-}$ e acúmulo do H_2O_2 no sobrenadante das culturas celulares. Quando ativados por IFN- γ e LPS macrófagos produzem $\bullet NO$. Quando previamente ativados e infectados, macrófagos foram capazes de produzir outra espécie reativa, o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). Nossos dados demonstram que estas diferentes espécies reativas de oxigênio e $\bullet NO$ são relevantes para a eliminação do parasito por macrófagos *in vitro* e também durante a infecção *in vivo* nos seus estágios iniciais. Assim, macrófagos de animais selvagens (WT) apresentaram menor percentual de infecção quando comparados aos macrófagos deficientes nas enzimas NADPH oxidase ($Phox^{-/-}$) e óxido nítrico sintase ($iNOS^{-/-}$) 72h após a infecção. Além disso, a produção de ROS e $\bullet NO$ nos estágios iniciais da infecção *in vivo* compromete a replicação do parasito no local da infecção. Animais $Phox^{-/-}$ apresentaram maior susceptibilidade à infecção por *L. infantum* seguidos de $iNOS^{-/-}$ e por fim, com menor carga parasitária, os animais WT. Esta maior carga parasitária pode se relacionar também a diferenças no infiltrado celular inflamatório nos animais $Phox^{-/-}$ nos estágios iniciais da infecção quando comparados aos animais WT e $iNOS^{-/-}$. A deficiência na expressão da NADPH oxidase induziu maior migração de neutrófilos 12 horas após a infecção e estas células foram as responsáveis por carrear os parasitos neste tempo.

Uma maior produção de CXCL1 e CXCL2 por animais *Phox^{-/-}* 12h após a infecção associada aos índices aumentados de necrose em neutrófilos em relação aos WT pode explicar uma maior taxa de migração de neutrófilos nesses camundongos e a manutenção da diferença deste infiltrado nos tempos entre 24 e 72 horas. Além disso, uma menor migração de monócitos foi observada nesses animais. Dessa forma, descrevemos, pela primeira vez, que as espécies reativas de oxigênio influenciam, de diferentes formas, os estágios iniciais da infecção por *L. infantum* sendo essenciais na eliminação do parasito, modulação da produção de quimiocinas, migração diferencial de células e regulação da necrose de neutrófilos.

Palavras-chave: leishmaniose; *Leishmania infantum*; espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are a group of ions, radicals and highly reactive molecules derived from oxygen metabolism. They participate in many biological processes from hormone biosynthesis, cell signaling and killing of microbial pathogens. They are produced by phagocytes when properly stimulated. NADPH oxidase is the enzyme responsible for the conversion of O_2 to $O_2^{\cdot-}$ using NADPH as electron donor. Several studies have shown different effects of ROS in infections caused by parasites of the genus *Leishmania*. In the present work we focus on the determination of the different oxygen species generated by macrophages when infected by *Leishmania infantum* and the influence of these radicals in the early inflammatory cell infiltrate after intradermal infection. We showed that *L. infantum*-infected macrophages produced high levels of $O_2^{\cdot-}$ and we detected H_2O_2 in the supernatant of cell cultures. Moreover, wild-type (WT)- and NADPH oxidase deficient ($Phox^{-/-}$)-activated macrophages produced similar amount of $\bullet NO$. Besides, when activated and infected, only WT macrophages produced peroxynitrite. Our data demonstrated that these different oxygen species have an important effector role since there was decrease in the percentage of infected cells. A difference was found when comparing the percentages of infection between WT, $Phox^{-/-}$ and nitric oxide synthase deficient ($iNOS^{-/-}$) macrophages, suggesting an important role of peroxynitrite in the in vitro parasite killing. The oxygen species produced by phagocytes play roles in the modulation of protein expression and transcription factors, induction of cell death by apoptosis and killing of parasites in vivo. Initially, we showed that there were differences in parasite load in WT, $Phox^{-/-}$ and $iNOS^{-/-}$. $Phox^{-/-}$ showed higher parasite load, followed by $iNOS^{-/-}$ and WT animals. We compared the cellular infiltrate influenced by the absence of expression of the enzyme NADPH oxidase and inducible nitric oxide synthase. The deficiency in the expression of NADPH oxidase induced larger neutrophil migration, peaking at 12 hours after infection. These cells were the main cell type harboring parasites at this time. The presence of the parasite induced apoptosis in neutrophils, but we did not find any differences between $Phox^{-/-}$ and WT mice. However, we found differences in neutrophil necrosis. $Phox^{-/-}$ mice showed more necrosis than WT in all time periods. Furthermore, neutrophil influx was coincident with higher levels of CXCL1

and CXCL2 detected in Phox^{-/-} but not in WT and iNOS^{-/-} mice. We suggest that the neutrophil maintenance at the site of infection in the times between 24 and 72 hours was due the higher chemokine production and necrosis in Phox^{-/-}. Our data suggest for the first time that reactive oxygen species directly influence the elimination of the parasite modulating chemokine production, differential cell migration and neutrophil necrosis regulation in the early stages of infection by *L. infantum*.

Keywords: leishmaniasis; *Leishmania infantum*; reactive oxygen species.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Taxonomia do gênero *Leishmania*.** Adaptado de Banuls, Hide et al. (2007). Espécies sublinhadas têm sido questionadas quanto à sua classificação. Das 30 espécies conhecidas, cerca de 20 são patogênicas para humanos. Banuls, Hide et al. (2007) **22**
- Figura 2: Distribuição geográfica da Leishmaniose cutânea (OMS, 2012).** **25**
- Figura 3: Distribuição geográfica da Leishmaniose visceral (OMS, 2012).** **26**
- Figura 4: Estados de ativação da NADPH oxidase.** À esquerda é representado o estado inativado da enzima, onde os complexos multiméricos estão separados. Quando há sinalização apropriada há fosforilação de p47, o que permite associação dos complexos citoplasmáticos com os transmembranares para a ativação da enzima, representado à direita. Fonte: (BABIOR, 2004)..... **33**
- Figura 5: Produção de $O_2^{\cdot -}$ pela NADPH oxidase de macrófagos de camundongos WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}*.** Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* (10^6 por poço) permaneceram sem estímulo, foram estimulados com Zymosan, ou infectados com 10^7 promastigotas de *L. infantum* de cultura em fase estacionária. Cinética de produção de $O_2^{\cdot -}$ (A, B e C). Representação gráfica em barra da produção de $O_2^{\cdot -}$ considerando a área abaixo das curvas (D). Macrófagos de camundongos C57BL/6 WT foram estimulados ou não com 100 U/mL de IFN- γ e 100ng de LPS. 300 μ M de apocinina foi usada para inibir a ativação da NADPH oxidase e a produção de $O_2^{\cdot -}$ foi representada por gráfico de barras (E). A reação das ROS com o luminol é capaz de gerar fótons, sendo essa luz detectada pelo luminômetro e quantificada em unidades relativas de luz por segundo. Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão são de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA two-way) * indica $P < 0,05$ **53**
- Figura 6: *L. infantum* induz a formação de H_2O_2 por macrófagos de camundongos WT.** Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 WT (5×10^5 por poço) permaneceram sem estímulo, ou foram estimulados com IFN- γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) por quatro horas. Apocinina (300 μ M) foi adicionada 30 minutos antes dos macrófagos serem infectados com 5×10^6 de promastigotas de *L. infantum* de cultura em fase estacionária. A detecção dos níveis de H_2O_2 no sobrenadante das culturas foi feito pela utilização de Amplex® Red seguindo as instruções do fabricante. Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). Análise estatística feita por análise de variância (ANOVA two-way). **54**

Figura 7: Produção de NO por macrófagos de camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-}. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} (10⁶ por poço) permaneceram sem estímulo, ou foram estimulados com IFN-γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) por uma noite, ou infectados com 1x10⁷ de promastigotas de *L. infantum* de cultura em fase estacionária. O sobrenadante das culturas foi coletado após 48 horas da infecção e usados para medição dos níveis de nitrito pelo método de Greiss. Os dados mostrados como média ± desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). **55**

Figura 8: Detecção de ONOO⁻ em macrófagos induzida por promastigotas de *L. infantum*. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} (10⁶ por poço) permaneceram sem estímulo, ou foram estimulados com IFN-γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) por quatro horas. Catalase (1000U/mL), superóxido dismutase (100U/mL), L-NAME (0,5mM), apocinina (300μM) e CBA (100μM) foram adicionados 30 minutos antes dos macrófagos serem infectados com 1x10⁷ de promastigotas de *L. infantum* de cultura em fase estacionária. A detecção da oxidação da sonda CBA foi seguida por uma hora e 30 minutos. Valores da linha de tendência de cada curva foram usados como referência da oxidação da sonda. Dados mostrados como média ± desvio padrão de um experimento representativo de quatro (n=3 por grupo em cada experimento). Análise estatística feita por análise de variância (ANOVA two-way). * indica P<0,05. **57**

Figura 9: Avaliação da carga parasitária in vitro. Macrófagos de camundongos C57BL/6 WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram cultivados em uma concentração de 5 x 10⁶/mL. As células foram estimuladas ou não com IFN-γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) por 12 a 16 horas. Em seguida os macrófagos aderidos foram infectados com *L. infantum* em uma relação de dez parasitos por macrófago. Após quatro e 72 horas de infecção a porcentagem de macrófagos infectados [A e B] e o número de parasitos por macrófagos infectados [C e D] foram determinados. As lamínulas foram coradas com Diff-Quick (ver Materiais e Métodos). A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA two-way) e seguidos de teste de Tukey. * indica P<0,05..... **59**

Figura 10: Carga parasitária nas orelhas de camundongos. Orelhas de camundongos C57BL/6 WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram infectadas na derme com 10⁶ formas metacíclicas de *L. infantum* e a infecção foi seguida entre seis e 72 horas. A carga parasitária foi estimada por diluição seriada entre sete e dez dias de cultura. Os dados mostrados como média ± desvio padrão de um experimento representativo de 2 (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-}, # indica diferenças entre WT e iNOS^{-/-} e φ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde P< 0,05 (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni). **60**

Figura 11: Estratégia de identificação das populações de células recrutadas para o local da infecção com *L. infantum* RFP. Orelhas de camundongos WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* foram infectadas com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e o recrutamento celular foi seguido no intervalo entre 6 horas e 72 horas após a infecção. As orelhas foram coletadas, processadas e em seguida as células tiveram seus marcadores de superfície corados com anticorpos específicos. Imagem representativa de uma amostra 12 horas após a infecção. 62

Figura 12: Porcentagem e número de células CD11b⁺ recrutadas para o local de inoculação de *L. infantum* RFP após 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. Orelhas de camundongos foram infectadas com 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e a infecção foi seguida pelos tempos indicados nas figuras. Dados representam a porcentagem (A) e o número de células (B) expressando o marcador CD11b. Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e *Phox^{-/-}*, # indica diferenças entre WT e *iNOS^{-/-}* e ϕ indica diferenças entre *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* onde $P < 0,05$ (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni). 63

Figura 13: Cinética do recrutamento de células mieloides após inoculação intradérmica de *L. infantum* RFP. Dot plots representativos das células recuperadas em diferentes tempos após a infecção intradérmica com 10^6 *L. infantum* RFP ou orelhas não infectadas como controle (NI). As subpopulações de células mieloides CD11b⁺ foram definidas seguindo as seguintes marcações: neutrófilos ($\text{Ly6G}^+ \text{Ly6C}^{\text{int}}$); monócitos ($\text{Ly6G}^- \text{Ly6C}^{\text{int/hi}}$); células dendríticas ($\text{Ly6G}^- \text{Ly6C}^+ \text{CD11c}^+ \text{MHC II}^+$) e macrófagos ($\text{Ly6G}^- \text{Ly6C}^+ \text{CD11c}^- \text{MHC II}^+ \text{F4/80}^+$). Os dados mostrados são de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). 66

Figura 14: Porcentagem das subpopulações de células CD11b⁺ recrutadas para o local de inoculação de *L. infantum* RFP após 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. Orelhas de camundongos WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* foram infectadas com 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para realização imunofenotipagem por citometria de fluxo. Dados representam a porcentagem de neutrófilos (A), monócitos (B), células dendríticas (C) e macrófagos (D). Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e *Phox^{-/-}*, # indica diferenças entre WT e *iNOS^{-/-}* e ϕ indica diferenças entre *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* onde $P < 0,05$ (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni). 67

Figura 15: Número absoluto das subpopulações de células CD11b⁺ recrutadas para o local de inoculação de *L. infantum* RFP após 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. Orelhas de camundongos WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* foram infectadas com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos

indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para realização imunofenotipagem por citometria de fluxo. Dados representam os números absolutos de neutrófilos (A), monócitos (B), células dendríticas (C) e macrófagos (D). Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-}, # indica diferenças entre WT e iNOS^{-/-} e ϕ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde P < 0,05 (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni)..... **68**

Figura 16: Cinética das subpopulações de células mieloides infectadas por *L. infantum* RFP. Dot plots representativos das células infectadas recuperadas em diferentes tempos após a infecção intradérmica com 1×10^6 *L. infantum* RFP. As subpopulações de células mieloides RFP⁺CD11b⁺ foram definidas seguindo as seguintes marcações: neutrófilos (Ly6G⁺Ly6C^{int}); monócitos (Ly6G⁻ Ly6C^{int/hi}); células dendríticas (Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺MHC II⁺) e macrófagos (Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺MHC II⁺F4/80⁺). Os dados mostrados são de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). **70**

Figura 17: Cinética de infecção de células CD11b⁺. Camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} infectados com 10^6 formas metacíclicas de *L. infantum* RFP na orelha foram sacrificados nos tempos indicados. A porcentagem de células CD11b⁺ com sinal RFP, oriundo do parasito foi quantificado por citometria de fluxo (A), assim como o número total de células CD11b⁺RFP⁺ (B). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-} e ϕ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde P < 0,05 (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni)..... **71**

Figura 18: Porcentagem das subpopulações de células RFP⁺CD11b⁺. Orelhas de camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram infectadas com 10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para realização imunofenotipagem por citometria de fluxo. Dados representam a porcentagem de células RFP⁺CD11b⁺ que são neutrófilos (A), monócitos (B), células não inflamatórias (C). Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-} e ϕ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde P < 0,05 (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni). **73**

Figura 19: Número de células RFP⁺CD11b⁺. Orelhas de camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram infectadas com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para realização imunofenotipagem por citometria de fluxo. Dados representam o número de células RFP⁺CD11b⁺ que são neutrófilos (A), monócitos (B), células não inflamatórias (C). Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-}, # indica diferenças entre WT e iNOS^{-/-} e ϕ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde P < 0,05 (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni). **74**

Figura 20: Diferenças na produção de CXCL1 e CXCL2 no local da infecção com *L. infantum*. Camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram infectados na orelha intradermicamente com 10⁶ formas metacíclicas de *L. infantum* e nos tempos indicados foram eutanasiados e suas orelhas coletadas para a dosagem dos níveis de CXCL-1 (A), CXCL-2(B) e CCL2 (C) por ELISA. Os dados são apresentados como média ± EP para cada grupo (3 por grupo). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-} e φ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde P< 0,001. (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni)..... **76**

Figura 21: Indução de apoptose e necrose na população de neutrófilos infectados por *L. infantum* RFP. Avaliação das porcentagens de apoptose (A) e necrose (B) em neutrófilos/*L. infantum*-RFP⁻ e neutrófilos/*L. infantum*-RFP⁺ recuperados em diferentes tempos após a infecção intradérmica com 10⁶ *L. infantum* RFP. A população de neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺ caracterizada por Anexina V⁺ 7-AAD⁻ (apoptose) e 7-AAD⁺ (necrose). Os dados mostrados são de um experimento representativo (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-} onde P< 0,05 (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni). **80**

Figura 22: Cinética de apoptose e necrose na população de neutrófilos infectados por *L. infantum* RFP. Dot plots representativos das células infectadas recuperadas em diferentes tempos após a infecção intradérmica com 1x10⁶ *L. infantum* RFP. A população de neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺ caracterizada por Anexina V⁺ 7-AAD⁻ (apoptose) e 7-AAD⁺ (necrose). Os dados mostrados são de um experimento representativo (n=3 por grupo em cada experimento)..... **81**

Figura 23: Porcentagem e número total de neutrófilos em apoptose e necrose no local da infecção por *L. infantum* RFP. Orelhas de camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram infectadas com 1x10⁶ promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para análise por citometria de fluxo. Dados representam a porcentagem de apoptose (A) e necrose (B) em neutrófilos e número de neutrófilos morrendo por apoptose (C) e necrose D). Orelhas não infectadas (NI). Os dados mostrados como média ± desvio padrão de um experimento representativo (n=3 por grupo em cada experimento). A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA two-way). * indica P<0,05. **82**

Figura 24: Porcentagem e número total de neutrófilos infectados em apoptose e necrose no local da infecção por *L. infantum* RFP. Orelhas de camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram infectadas com 1x10⁶ promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para análise por citometria de fluxo. Dados representam a porcentagem de apoptose (A) e necrose (B) em neutrófilos infectados e número de neutrófilos infectados morrendo por apoptose (C) e necrose (D). Os dados mostrados como média ± desvio padrão de um experimento representativo (n=3 por grupo em cada experimento). A análise

estatística foi feita por análise de variância (ANOVA two-way). * indica $P < 0,05$.

..... 83

Figura 25: Cortes histológicos da pele de orelha de camundongos C57BL/6 WT e $Phox^{-/-}$ infectados por *L. infantum*. A) Orelha de camundongos WT com inflamação intensa. B) Detalhe da figura em maior aumento evidenciando infiltrado inflamatório misto com neutrófilos (cabeça de setas branca), linfócitos (cabeça de setas preta grande) e alguns macrófagos com algumas *Leishmanias* (cabeça de setas pretas pequenas). Em C) observar orelha de camundongo $Phox^{-/-}$ com inflamação intensa, difusa e área de necrose (N). D) detalhe de infiltrado inflamatório misto evidenciando neutrófilos (cabeça de setas preta e grande) e macrófagos com amastigotas de *Leishmania* (cabeça de setas preta pequena). EP – epiderme; C – cartilagem, N – necrose. INF - inflamação. A - D coloração pela H&E. Barra em A e C representa 62 μm (50x) e em B e D - 16 μm (400 x).

..... 85

Figura 26: Imuno-histoquímica da pele de orelha de camundongos C57BL/6 WT (A e B) e $Phox^{-/-}$ (C e D) infectados por *L. infantum* e quantificação de parasitos (E). Evidenciar amastigotas imunomarcadas (marrom) (cabeça de setas pretas). E) análise semi-quantitativa da intensidade parasitarias nas diferentes linhagens. 1 –ausente, 2 – discreto, 3 – moderado e 4 – intenso. Barra em A e C representa 32 μm (200x) e B e D - 16 μm (400 x)..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:Resumo das espécies reativas produzidas por macrófagos 58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

7-AAD: 7-amino actinomicina D

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benz-tiazolinosulfônico

ANOVA: Análise de variância

BOD: Demanda bioquímica de oxigênio

CGD: Doença granulomatosa crônica

CR1: Receptor de complementor 1

CR3: Receptor de complementor 3

CCL#: Ligantes de receptores de quimiocinas CC

CCR#: Receptores de quimiocinas CC

CD#: Cluster of differentiation

CXCL#: Ligantes de receptores de quimiocinas CXC

DAMPs: Padrões moleculares associados a danos

DC: Célula dendrítica

DNase: Desoxiribonuclease

DMEM: Meio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetra-acético

ELISA: Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Fc: Fração cristalizável das imunoglobulinas

GIPs: Glicoinositol fosfolípidios

IFN: Interferon

IFNGR: Receptor de interferon gamma

IL-#: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintase indutível

L-NAME: N ω -Nitro-L-arginina cloridrato de éster metil

LPG: Lipofosfoglicano

LPS: Lipopolissacarídeo

MCP-1/CCL2: Proteína 1 quimiotática de monócito

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

mRNA: RNA mensageiro

MPO: Mieloperoxidase

NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NETs: Neutrophil Extracellular Traps

NK: Células exterminadoras naturais

NI: Células não inflamatórias

NO: Óxido nítrico

OD: Densidade óptica

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos

PBS: Salina tamponada com fosfato 0,1 M, pH 7,3 (Phosphate Buffered Saline)

PM: Membrana periotrófica

PSG: Gel secretado por promastigotas

RFP: Proteína fluorescente vermelha (Red fluorescent protein)

RNase: Ribonuclease

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RNS Espécies reativas de nitrogênio

RPMI: Meio do Instituto Roswell Park Memorial

SBF: Soro bovino fetal

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SOD: Superóxido dismutase

SSA: Solução saturada de sulfato de amônia

Th#: Células T auxiliares do tipo #

TMB: Tetrametilbenzina

TNF: Fator de necrose tumoral

U: Unidades

Wt: Tipo selvagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 - Classificação do gênero <i>Leishmania</i>	21
1.2 - Ciclo biológico	22
1.3 - Epidemiologia	24
1.4 - Aspectos clínicos das leishmanioses	26
1.5 - Modelos experimentais	28
1.6 - Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	32
1.7- Efeito de ROS nas infecções por <i>Leishmania</i>	34
2- JUSTIFICATIVA	39
3 - OBJETIVOS	40
3.1 - Objetivo geral	40
3.2 - Objetivos específicos	40
4 - Materiais e métodos:.....	41
4.1 - Parasitos:	41
4.2 - Camundongos	42
4.3 - Infecção <i>in vivo</i> com <i>L. infantum</i>	42
4.4 - Eutanásia dos animais e retirada de órgãos	43
4.5 - Quantificação da carga parasitária	43
4.6 - Obtenção de macrófagos derivados de monócitos de medula óssea e infecção <i>in vitro</i> por formas amastigotas de <i>L. infantum</i>	43
4.7- Produção <i>in vitro</i> de espécies reativas de oxigênio (ROS) e dosagem de nitrito	44
4.7.1- Superóxido:.....	44

4.7.2 - Peróxido de Hidrogênio:	45
4.7.3 - Dosagem de nitrito:	45
4.7.4 - Peroxinitrito:	46
4.8 - Citometria de fluxo.....	47
4.9 - Detecção de quimiocinas por ELISA	47
4.10 - Análise histopatológica	48
4.11 - Análise estatística.....	50
5 - RESULTADOS.....	51
5.1 - Interação de macrófagos com <i>Leishmania infantum</i>	51
5.1.1 - Promastigotas de <i>L. infantum</i> induzem a produção de O ₂ ^{•-} pela NADPH oxidase de macrófagos.....	51
5.1.2 - Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos infectados com <i>L. infantum</i>	53
5.1.3 - Produção de NO por macrófagos infectados por <i>L. infantum</i>	54
5.1.4 - Promastigotas de <i>L. infantum</i> induzem formação de peroxinitrito em macrófagos estimulados por IFN-γ e LPS	56
5.1.5 - Macrófagos de camundongos C57BL/6 WT, Phox ^{-/-} e iNOS ^{-/-} apresentam diferenças no perfil de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pós infecção por <i>L. infantum</i>	58
5.2 - Infecções de camundongos com <i>L. infantum</i>	60
5.2.1 - Diferenças na carga parasitária nas orelhas de camundongos infectados com <i>L. infantum</i> RFP.....	60
5.2.2 - Cinética de migração celular para o sítio de infecção	61
5.2.3 - Análise das subpopulações mielóides infectadas por <i>L. infantum</i> RFP	69
5.2.4 - Produção de quimiocinas no sítio da infecção por <i>L. infantum</i>	75
5.2.5 – Ausência de ROS induz morte de neutrófilos por necrose no local da infecção por <i>L. infantum</i>	77
5.2.6 - Análise histológica de orelhas infectadas por <i>L. infantum</i>	84

6 - DISCUSSÃO	87
7 - CONCLUSÃO	101
8 - BIBLIOGRAFIA	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Classificação do gênero *Leishmania*

A família Trypanosomatidae consiste de um numeroso grupo de protozoários parasitas flagelados que causam infecções em humanos e animais. As doenças infecciosas mais importantes no homem são causadas por espécies do gênero *Trypanosoma* (doença do sono e doença de Chagas) e do gênero *Leishmania* (Leishmanioses).

A taxonomia do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida) iniciou com sua descoberta em 1903 por Donovan e Leishman que separadamente descreveram o parasita isolado do baço de doentes na Índia (HERWALDT, 1999). Porém, até hoje não há consenso na divisão taxonômica devido ao uso de diferentes critérios de classificação (HOMMEL, 1999). A classificação do gênero *Leishmania* foi inicialmente baseada em critérios ecobiológicos como os baseados em vetores, distribuição geográfica, tropismo, propriedades antigênicas e manifestações clínicas (BRAY, 1974; LUMSDEN, 1974; PRATT; DAVID, 1981). Entretanto, análises bioquímicas e moleculares se mostram contrárias às classificações baseadas nos critérios geográficos e patológicos. Com isso, outros critérios como os padrões de polimorfismo exibidos por marcadores de DNA kinetoplasto (kDNA), proteínas ou antígenos estão sendo usados para classificar as espécies do gênero *Leishmania* (BANULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007). As duas espécies mais frequentemente associadas à leishmaniose visceral são *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum*. *Leishmania chagasi* é geralmente citada como sinônimo de *L. infantum*, sendo essas duas espécies praticamente indistinguíveis (MAURÍCIO; STOTHARD, 2000) e, recentemente, descobriu-se que a espécie designada *L. chagasi* não tem diferenças genéticas suficientes que a distinguissem da espécie *L. infantum* (ALVARENGA *et al.*, 2012).

Para estudos epidemiológicos, a ferramenta mais usada para classificação são as análises de isoenzimas. Com cerca de 12 enzimas pode-se adequadamente distinguir entre todas as espécies descritas. Cada espécie pode possuir um número distinto de zimodemos, cada um caracterizado por um conjunto de isoenzimas (RIOUX *et al.*, 1990).

A figura 1 ilustra um moderno esquema de classificação do gênero *Leishmania*.

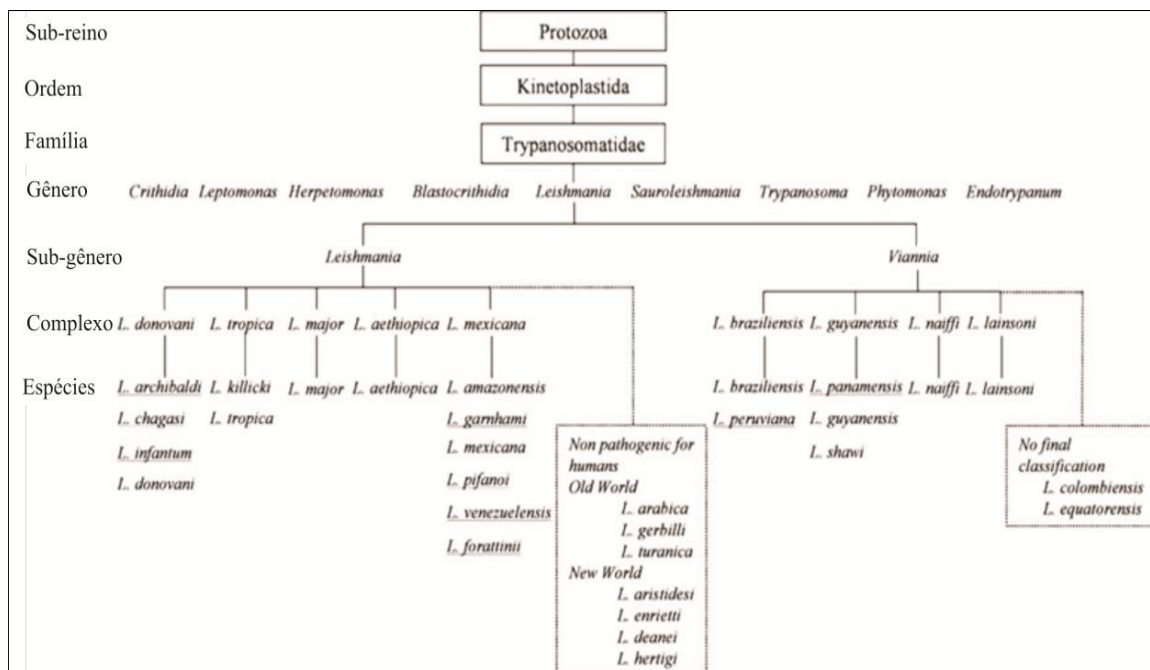


Figura 1: Taxonomia do gênero *Leishmania*. Adaptado de Banuls, Hide et al. (2007). Espécies sublinhadas têm sido questionadas quanto à sua classificação. Das 30 espécies conhecidas, cerca de 20 são patogênicas para humanos. Banuls, Hide et al. (2007)

1.2 - Ciclo biológico

As leishmanioses são infecções encontradas em áreas tropicais e regiões subtropicais do mundo. Os parasitos são transmitidos por diferentes espécies de flebotomíneos (gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*), dependendo da localização.

Os dois principais estágios distintos de desenvolvimento do parasito são reconhecidos. As formas promastigotas, extracelulares, são encontradas e se multiplicam no trato digestório da fêmea do flebotomíneo e têm uma forma alongada e flagelo longo. Promastigotas são as formas infectantes. Estas se diferenciam em amastigotas, forma intracelular presente em células do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado com flagelo não externalizado (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005).

A infecção por *Leishmania* ocorre quando uma fêmea de flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo, inocula juntamente com sua saliva formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania sp* (BATES, 2007).

A diferenciação da forma amastigota para promastigotas no intestino do invertebrado é um processo que ocorre em decorrência da mudança no padrão de expressão de mRNA para diversas proteínas, como β -tubulina e ATPase. Queda na temperatura ambiental e aumento do pH são apontados como importantes fatores que desencadeiam este processo (CAMPBELL; RAINEY, 1993). Ao longo do seu desenvolvimento no trato digestivo a forma promastigota pode ser subdividida em diferentes tipos (BATES, 1994). As formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas, estágio que ocorre na membrana peritrofica durante a digestão do sangue ingerido pelas fêmeas após repasto sanguíneo. As formas procíclicas são curtas e com formato elíptico. Essas formas passam então por um processo de replicação e gradualmente se diferenciam em uma forma alongada que possui aproximadamente o dobro do tamanho da forma original. Essa promastigota é denominada nectomona. Este processo de diferenciação parece ser dependente da densidade de parasitos encontrado no intestino e, provavelmente, é induzido por alguma deficiência nutricional em decorrência deste processo. Aproximadamente três dias após o repasto sanguíneo as formas nectomonas escapam da membrana peritrofica na parte posterior do intestino e migram para a parte anterior do mesmo (BATES, 1994). Esta forma promastigota insere e fixa seu flagelo no epitélio intestinal. Este processo é dependente, dentre outros fatores, da expressão pelo parasito de um glicolípido denominado lipofosfoglicano (LPG) (PIMENTA *et al.*, 1992). Cinco dias após o repasto sanguíneo formas menores denominadas haptomonas podem ser encontradas na parte anterior do intestino, assim como formas denominadas paramastigotas, raras, em que se observa o núcleo próximo ao kinetoplasto. A partir deste período também se torna mais frequente a forma metacíclica, que é uma forma pequena, com alta mobilidade e que constitui a forma infectante para os hospedeiros vertebrados (SACKS, 1989; SACKS; PERKINS, 1984). Vale ressaltar que a forma procíclica e a forma haptomona são as que replicam, já as formas metacíclicas e nectomonas não são replicativas, de forma que estes parasitos passam, portanto, por duas fases de proliferação no intestino do vetor (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003;

WILSON *et al.*, 2010). Alguns autores consideram uma outra forma promastigota denominada leptomona, que seria a precursora da forma metacíclica (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; WILSON *et al.*, 2010). Para outros pesquisadores esta forma é desconsiderada para a contagem diferencial de promastigotas por ser morfológicamente idêntica à forma haptomona (FREITAS *et al.*, 2012; NIEVES; PIMENTA, 2002).

Interessantemente, a infecção do vetor pelo parasito altera alguns importantes fatores comportamentais no hospedeiro invertebrado que favorecem que o ciclo de vida da *Leishmania* não seja interrompido. Desta forma, *L. longipalpis* previamente infectados com *L. mexicana* ou *L. infantum* experimentalmente, passam mais tempo em um segundo repasto sanguíneo do que os não infectados (ROGERS; BATES, 2007). Este tipo de comportamento aumenta a chance de transmissão do parasito, e provavelmente se deve ao fato de que a *Leishmania* secreta um gel que dificulta o repasto pelo vetor. Este gel secretado por promastigotas forma um aglomerado com o próprio parasito, e provavelmente é o local onde ocorre o processo de metaciclogênese (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002). Além disso, vetores infectados tendem a picar mais hospedeiros que os não infectados, provavelmente pela dificuldade de se alimentar. Estas mudanças comportamentais em termos de alimentação favorecem a chance de transmissão e compensam o fato de que ao serem parasitados, os flebótomos tem sua expectativa de vida diminuída (ROGERS; BATES, 2007).

1.3 - Epidemiologia

Leishmanioses são um espectro de doenças predominantemente rurais e são endêmicas em 98 países em cinco continentes. Estima-se uma ocorrência de aproximadamente 400 mil novos casos da forma visceral (90% ocorrendo em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão), e mais de 1 milhão de novos casos da forma cutânea anualmente (90% ocorrendo em Afeganistão, Argélia, Brasil, Iran, Peru, Arábia Saudita, Sudão e Síria) (ALVAR *et al.*, 2012; OMS, 2004; SALAM; AL-SHAQHA; AZZI, 2014)

L. donovani, *L. infantum* e *L. major* causam doença do sul da Europa até a África, no Oriente Médio, e em todo sul da Ásia, enquanto outras espécies (por

exemplo *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. infantum*) são encontradas em toda América do Sul e Central (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005).

As leishmanioses constituem um sério problema de saúde pública mundial. Considerada uma doença negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sua incidência tem relação com altos índices de pobreza e baixos índices de desenvolvimento humano. Neste contexto, as condições habitacionais em regiões consideradas endêmicas podem favorecer a exposição aos flebotomíneos; o atraso no diagnóstico e tratamento aumenta as chances de infecções das pessoas que convivem com pacientes com lesões ativas e uma dieta pobre em diversidade de nutrientes favorece a progressão da doença e pode acentuar sua gravidade (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

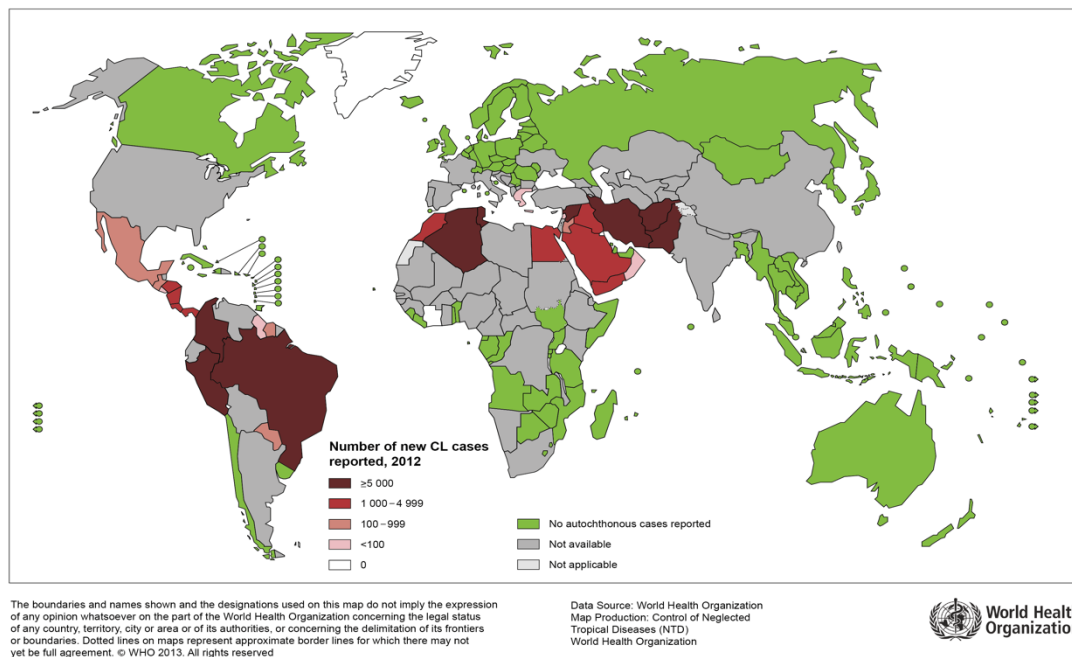


Figura 2: Distribuição geográfica da Leishmaniose cutânea (OMS, 2012).

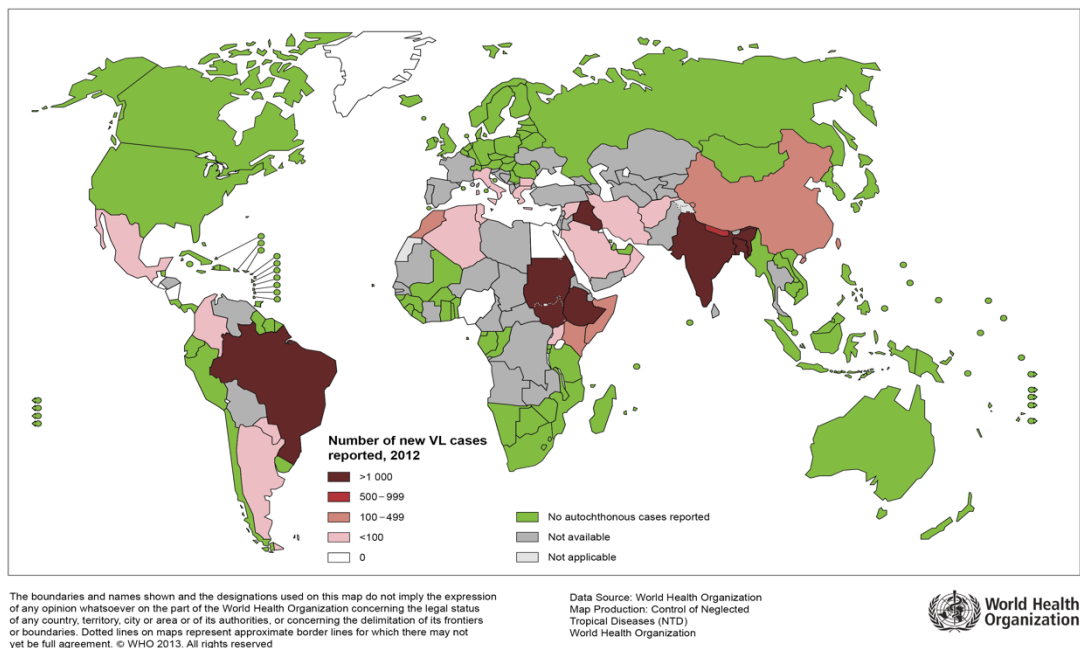


Figura 3: Distribuição geográfica da Leishmaniose visceral (OMS, 2012).

1.4 - Aspectos clínicos das leishmanioses

As leishmanioses tradicionalmente se dividem em três grandes grupos de acordo com aspectos clínicos: forma cutânea, mucocutânea e visceral (EVANS, 1993a).

A forma cutânea da doença caracteriza-se por ulcerações na pele no local da picada do flebotomíneo, usualmente em partes expostas do corpo como a face, pescoço, braços e pernas. Esta forma é causada por diversas espécies de *Leishmania*: *L. brazilienses*, *L. guyanensis*, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. amazonensis*. Os indivíduos doentes geralmente curam-se clinicamente, mas o tempo de cura varia entre as espécies infectantes e indivíduos. A doença pode se difundir pela pele do hospedeiro, sendo então conhecida como leishmaniose cutânea difusa. Essa doença pode ser causada pelas espécies *L. aethiopica*, *L. mexicana* e *L. amazonensis*, porém só ocorre quando os hospedeiros têm “baixa” imunidade (KEDZIERSKI; ZHU; HANDMAN, 2006; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Na leishmaniose mucocutânea, usualmente causada por *L. brazilienses*, a lesão inicial na pele pode se curar espontaneamente ou mais tarde podem

desenvolver lesões com destruição parcial ou total de membranas mucosas. Indivíduos infectados e que apresentam desenvolvimento falho na resposta imunológica podem ter graves deformidades ou até mesmo morrer.

A leishmaniose visceral humana (LVH) é um grande problema de saúde pública mundial, estando entre as principais endemias de prioridade da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012). Estima-se uma prevalência de 12 milhões de indivíduos infectados no “Velho” e “Novo Mundo”, sendo 500 milhões de casos anuais e 200 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção (OMS, 2002). Cinco países merecem destaque, representando 90% dos casos, como a Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão. No Brasil, é uma doença de caráter endêmico e zoonótico, estendendo-se por todas as regiões, em especial o Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Predomina em zonas rurais com grande incidência em crianças (média de quatro a cinco anos de idade), mas nos últimos anos esse quadro está mudando. Tem sido verificada a urbanização da doença com ocorrência da infecção na periferia das grandes cidades como Rio de Janeiro, São Luiz, Fortaleza, Teresina, Jacobina, Santarém, Campo Grande e Belo Horizonte. Dessa forma o número de casos vem aumentando em cidades, onde o problema não era observado, concomitante ao aumento de casos de pessoas adultas infectadas e doentes (Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde, 2007).

As manifestações clínicas da LVH no Brasil são variadas sendo assim caracterizadas: (1) forma assintomática com cura espontânea e teste intradérmicos positivos para *Leishmania sp*; (2) forma subclínica ou oligossintomática, associada a manifestações inespecíficas (febrícula, tosse seca, adinamia, sudorese e hepatoesplenomegalia discreta), mas sem desenvolvimento ou progressão da doença; (3) forma subclínica ou oligossintomática com evolução para a forma clássica ou manifesta; (4) forma aguda com duração inferior a dois meses, com febre alta, tosse, diarreia, hepatoesplenomegalia e com elevação das globulinas do plasma IgM e IgG; (5) forma clássica ou manifesta da doença, sendo que o paciente apresenta febre diária, anorexia, emagrecimento, adinamia, sinais de desnutrição (pele seca, cabelos quebradiços, cílios longos), hepatoesplenomegalia acentuada, distúrbios gastrintestinais (diarreia) e fenômenos hemorrágicos (epistaxe e gengivorragia).

Desta forma pode-se notar a importância sócio-econômica da doença considerando-se a perda da força de trabalho dos pacientes adultos (casos aumentando com a urbanização) adicionados os gastos governamentais com a profilaxia e tratamento dos doentes (BADARO *et al.*, 1986; GAMA *et al.*, 2004).

1.5 - Modelos experimentais

Cães são hospedeiros naturais da *L. infantum* e são os modelos mais relevantes para a leishmaniose visceral. Cães e homens compartilham várias características das suas manifestações da doença como manifestação subclínica ou manifestação grave com evolução para a morte (ALVAR *et al.*, 2004). Entretanto, outras manifestações observadas em cães não são compartilhadas pelos humanos como queratite e patologias de pele (BANETH *et al.*, 2008). Devido ao alto custo e preocupações éticas, cães somente são usados em estudos limitados de leishmaniose visceral experimental. Assim modelos experimentais com pequenos roedores são usualmente preferidos.

Hamsters, similarmente aos cães e aos humanos, podem desenvolver doença progressiva fatal (GHOSH; GHOSH, 1987; MELBY *et al.*, 2001a; REQUENA *et al.*, 2000). Porém, hamsters desenvolvem imunocomplexos com antígenos do parasito que acabam se depositando nos rins e causando insuficiência renal e morte (SARTORI *et al.*, 1992). Morte devida à insuficiência renal na leishmaniose visceral é um evento raro em humanos e cães. A falta de reagentes para análises imunológicas e a susceptibilidade inata elevada destes animais fazem do hamster um modelo pouco conveniente para avaliações de resposta imune, porém hamsters permanecem como um modelo eficiente e mais relevante para testar drogas existentes e experimentais contra leishmaniose visceral.

Estudos em modelos murinos revelaram diferenças de respostas imunológicas nas infecções causadas por espécies de *Leishmania* causadoras de doença visceral e cutânea. Modelos murinos são usados extensivamente para o estudo de infecções por *L. donovani* e *L. infantum*. Estes possuem bases genéticas estabelecidas e as linhagens BALB/c e C57BL/6 são consideradas linhagens susceptíveis à leishmaniose visceral (BLACKWELL *et al.*, 1989; CROCKER;

BLACKWELL; BRADLEY, 1984), embora estas linhagens adquiram respostas que controlam o crescimento do parasito em um estágio tardio da infecção.

A partir do momento da picada do flebótomo infectado, são acionados mecanismos de resposta imune inata no local da picada e a rede de citocinas produzidas irá manter o elo entre as respostas imunes inata e adquirida. Esta relação parasito-hospedeiro é influenciada por fatores como os componentes da saliva do vetor, as proteínas de superfície e secretadas do parasito, além dos diferentes perfis de resposta imunológica que podem ser desencadeadas no hospedeiro.

Os mecanismos imunológicos que conferem resistência ou suscetibilidade à infecção por parasitos do gênero *Leishmania* foram bem caracterizados em modelos de infecção com *L. major*. Camundongos da linhagem C57BL/6, quando infectados por este parasito, desenvolvem uma resposta T_H1 , sendo capazes, portanto, de controlar a infecção e eliminar o parasito. A produção de IL-12 pelas células dendríticas, leva à diferenciação e proliferação de células T_H1 a partir da indução de IFN- γ , via STAT-1, que leva a expressão de T-bet, fator de transcrição considerado uma assinatura deste tipo de resposta (JACOBSON *et al.*, 1995; KAPLAN *et al.*, 1996a; SZABO *et al.*, 2000). A relevância da produção de IFN- γ para a eliminação do parasito e controle da infecção se deve ao fato de que esta citocina é um importante fator de ativação dos macrófagos, as principais células hospedeiras da *Leishmania*. Uma vez ativados pelo IFN- γ os macrófagos infectados por formas amastigotas do parasito aumentam a expressão da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) que, a partir do metabolismo de L-arginina, leva à produção de altos níveis de óxido nítrico ($\bullet$ NO), favorecendo a eliminação da *L. major* (GREEN *et al.*, 1990a). A indução de iNOS se dá através do sinergismo entre IFN- γ e TNF, citocina produzida pelo próprio macrófago infectado (GREEN *et al.*, 1990b). Ocorre uma polarização da resposta T_H2 quando camundongos da linhagem BALB/c são infectados por *L. major*. Esta é caracterizada pela produção de IL-4, via STAT-6, que leva à expressão de GATA-3, o fator de transcrição relacionado com este tipo de resposta (KAPLAN *et al.*, 1996b; ZHENG; FLAVELL, 1997). A IL-4 quando ativa macrófagos induz o metabolismo de L-arginina pela enzima arginase I e não mais pela iNOS, através do aumento da expressão desta enzima. Desta forma ocorre a produção de poliaminas, e não mais de $\bullet$ NO, que são essenciais para a proliferação celular, o que favorece a replicação

do parasito. Além disso, devido ao consumo de L-arginina do meio extracelular, as células T passam por uma imunossupressão, proliferando menos e passando a produzir ainda menos IFN- γ (MODOLELL *et al.*, 2009). Diante deste quadro, estes camundongos se tornam susceptíveis à infecção, sendo incapazes de controlar a proliferação do parasito.

Em camundongos, a resposta imune contra *L. donovani* ou contra *L. infantum* pode diferir dentro da mesma linhagem de camundongo variando marcadamente entre diferentes órgãos (ex.: fígado e baço) (MURRAY *et al.*, 1987). Durante a infecção de camundongos por *L. infantum*, formas amastigotas se multiplicam rapidamente durante as quatro primeiras semanas no fígado, mas a carga diminui espontaneamente a partir da oitava semana, enquanto que no baço, os parasitas crescem a pequenas taxas (WILSON *et al.*, 1996). Semelhante a observações feitas em humanos, a resposta imune no baço dos camundongos é caracterizada por uma combinação de resposta inflamatória e regulatória (MURRAY *et al.*, 2000). Após a inoculação dos parasitos, na fase aguda da doença (aproximadamente 28 dias) a estrutura tecidual do órgão ainda está mantida. Os parasitos são fagocitados por células dendríticas e macrófagos na zona marginal do baço. Células dendríticas também podem adquirir antígenos do parasito nesta mesma região e subsequentemente migrarem para bainha linfóide periarteriolar. As células dendríticas produzem IL-12 e apresentam os antígenos dos parasitos através do MHC II para células T e, conseqüentemente, induzem a proliferação de células T antígeno-específicas ativadas. Já na fase crônica (período acima de 28 dias pós a infecção), ocorre perda da estrutura tecidual, com significativa diminuição dos centros germinativos na polpa branca do baço. O fator responsável por este efeito é a migração de macrófagos altamente infectados da zona marginal para a bainha linfóide periarteriolar e que produzem níveis elevados de TNF. O TNF modula o recrutamento celular e regula positivamente a produção de IL-10. A IL-10, por sua vez, atua diretamente nas células dendríticas inibindo a expressão de CCR7 na superfície destas células e sua migração para a bainha linfóide periarteriolar. Assim, este cenário de alta de IL-10 e deficiência de células dendríticas efetoras contribui para a cronicidade da doença no baço com persistência do parasito (CARRION, 2011; MELBY *et al.*, 2001b; STANLEY; ENGWERDA, 2007; WILSON *et al.*, 1996).

A resolução da infecção no fígado de camundongos infectados com *L. donovani* ou *L. infantum* é correlacionada com a formação de granulomas. Após a inoculação dos parasitos, estes entram no fígado e parasitam macrófagos e células dendríticas. Durante a fase aguda neste órgão as formas amastigotas se multiplicam num ambiente sem a presença de IL-12 e de células T ativadas. Consequentemente, a carga parasitária aumenta e alcança o pico por volta de duas semanas após o inóculo dos parasitos. A partir da segunda semana os linfócitos T antígeno-específicos gerados no baço começam a migrar para o fígado. Assim, tem início a interação destas células com macrófagos e células dendríticas infectados e geração de um ambiente pró-inflamatório com características T_H1 . Este ambiente é necessário para a formação eficiente de granulomas maduros capazes de controlar o crescimento do parasito e a infecção (CARRION, 2011; STANLEY; ENGWERDA, 2007).

Ao contrário da infecção por *L. major*, não se sabe o papel de algumas citocinas na resposta contra infecção por espécies viscerais de *Leishmania* em camundongos. Atualmente é consenso o papel de IFN- γ , IL-2 e IL-12 atuando como citocinas essenciais na proteção de infecções causadas por *L. infantum* e *L. donovani*. As citocinas IL-10, supressora de resposta imune, e TGF- β , que inibe a produção de IFN- γ , suprimem a resposta protetora de camundongos contra as infecções por *L. infantum* e *L. donovani*, o que acaba por agravar a doença (MURRAY *et al.*, 1993; MURRAY *et al.*, 2002; MURRAY; HARIPRASHAD, 1995; WILSON *et al.*, 1998). O papel da citocina IL-4 na proteção ou susceptibilidade na infecção por espécies viscerais de *Leishmania* vem sendo muito discutido. Demonstrou-se que a produção de IL-4 foi detectada na fase intermediária da doença quando, coincidentemente, observam-se os maiores picos de parasitismo em linhagens susceptíveis. Não foi detectada IL-4 em linhagens resistentes (SAHA; BASAK; ROY, 1993). Por outro lado, nenhuma produção de IL-4 foi observada em três diferentes linhagens de camundongos infectados com *L. donovani* (KAYE; CURRY; BLACKWELL, 1991). Além disso, camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti-IL-4 e camundongos knockout para o gene da IL-4 não demonstraram melhora no controle da infecção (MIRALLES *et al.*, 1994).

O estabelecimento e desenvolvimento da infecção experimental no modelo murino é dependente da via de inoculação do parasito e do tamanho do inóculo, sendo

as vias endovenosa, intraperitoneal, subcutânea e intradérmica as mais utilizadas. Para a infecção por *L. infantum*, a via subcutânea está associada a uma proliferação mais rápida do parasito do que a via intravenosa (OLIVEIRA *et al.*, 2012a), ao passo que na infecção por *L. donovani* foi relatada polarização de resposta Th1 e menor número de parasitos nesta mesma via (KAUR *et al.*, 2008a). A utilização da via intradérmica através de agulha é a que melhor reproduz a deposição intradérmica fisiológica do parasito pela picada do vetor infectado. Imediatamente à deposição do parasito na derme do hospedeiro, os eventos seguintes relacionados às diferentes populações celulares atraídas para o local e suas interações com os parasitos são de extrema relevância para o entendimento da resposta imune efetora a ser desenvolvida. Dentre esses mecanismos efetores está a capacidade das células da resposta imune inata, responsáveis pela eliminação dos parasitos intracelulares e integração com a resposta imune adquirida, de gerar espécies reativas de oxigênio.

1.6 - Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são um grupo de íons, radicais e moléculas com oxigênio reativo. Participam de vários processos biológicos desde biossíntese hormonal, sinalização celular e eliminação de patógenos microbianos intracelulares e extracelulares. Podem ser gerados na mitocôndria como produto da cadeia respiratória, mas de forma altamente inespecífica (RADA; LETO, 2008). São também um dos principais mecanismos efetores de resposta contra patógenos intracelulares induzidos por IFN- γ ou por receptores do tipo toll e proteínas do sistema complemento. (CALEGARI-SILVA *et al.*, 2009; KAVOOSI; ARDESTANI; KARIMINIA, 2009; PAWATE *et al.*, 2004; PEREIRA; ALVES, 2008)

Neutrófilos e macrófagos produzem ROS em resposta à fagocitose ou pela estimulação de ligantes aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs – pattern recognition receptors). Estes padrões podem ser de origem patogênica, padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs – pathogen-associated molecular patterns) ou de origem de dano tecidual (DAMPs – damaged-associated molecular patterns) (CARTA *et al.*, 2009; OGIER-DENIS; MKADDEM; VANDEWALLE, 2008). A ativação endotelial também pode induzir ROS por neutrófilos (NAUSEEF, 2007). Para sua produção é necessária formação das NADPH oxidases. Estas enzimas possuem subunidades associadas à membrana e ao citoplasma de uma

variedade de células de origem mesodérmica. Porém, a maioria dos estudos sobre estas enzimas se concentra em fagócitos profissionais e linfócitos B. Elas catalisam a produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pela redução do oxigênio usando NADPH como doador de elétrons (BABIOR, 1999).

A estrutura da NADPH é composta de duas subunidades transmembrana (gp91_{PHOX} e p22_{PHOX}), três componentes citosólicos (p67_{PHOX}, p47_{PHOX} e p40_{PHOX}) e uma proteína Guanosina trifosfatase pequena (rac1 ou rac2). As proteínas racs são mantidas inativas pela ligação de um inibidor da dissociação de nucleotídeos de guanina, que impede a troca de nucleotídeos de guanina pelas racs. A ativação da NADPH oxidase é associada ao acoplamento de componentes citoplasmáticos nas subunidades transmembranares (BABIOR, 2004).

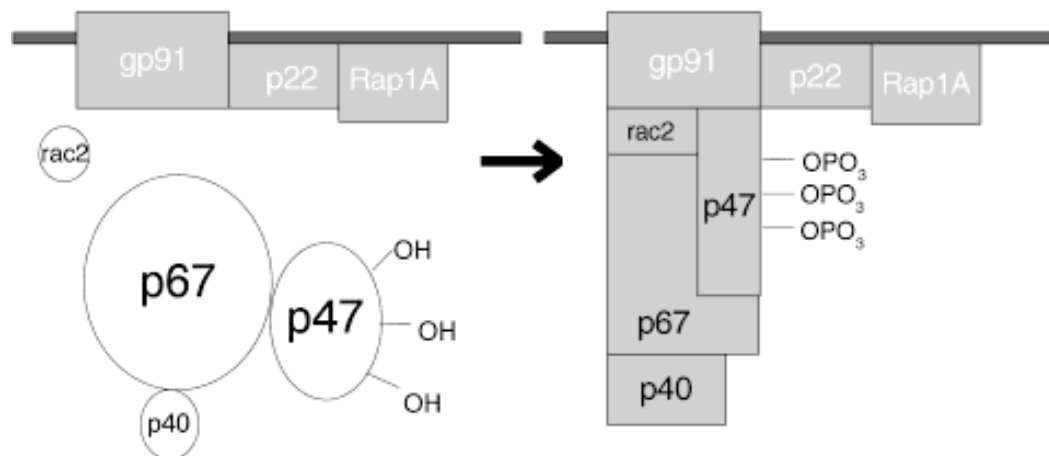


Figura 4: Estados de ativação da NADPH oxidase. À esquerda é representado o estado inativado da enzima, onde os complexos multiméricos estão separados. Quando há sinalização apropriada há fosforilação de p47, o que permite associação dos complexos citoplasmáticos com os transmembranares para a ativação da enzima, representado à direita. Fonte: (BABIOR, 2004).

Na presença de estímulos apropriados, como a fagocitose disparada pela ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) com receptores do tipo toll, há a ativação de p38 MAP cinase via MyD88. Com isso, há a fosforilação de p47_{PHOX}, o que expõe o sítio de ligação para o acoplamento de p22_{PHOX} (LAROUX *et al.*, 2005). O acoplamento das três subunidades (p22_{PHOX}, p47_{PHOX} e gp91_{PHOX}) permite o recrutamento de p67_{PHOX} (LETO; ADAMS; DE, I, 1994), que após a interação com rac, expõe seu sítio de ligação à gp91_{PHOX} ativando a produção de superóxido (MIZRAHI *et al.*, 2006).

A subunidade gp91_{PHOX} é essencial para o funcionamento da NADPH oxidase. Essa subunidade é a responsável pela redução do oxigênio molecular pela doação de elétrons provindos do NADPH (SHATWELL; SEGAL, 1996).

O superóxido gerado por esta enzima serve como molécula inicial para produção de vários reativos de oxigênio, incluindo halógenos oxidados, radicais livres e singletos de oxigênio. Esses oxidantes gerados são usados pelos fagócitos para destruir microrganismos invasores, mas também podem causar vários danos ao tecido do hospedeiro. Por isso, a ação NADPH oxidase é altamente regulada e somente é ativada sob estímulo (BABIOR, 1999). Animais deficientes de NADPH oxidase (referido no presente estudo por Phox^{-/-}) desenvolvem doença granulomatosa crônica ligada ao X (DGC)(BABIOR, 2004), a qual está associada à deficiência desses animais em resolver infecções microbianas, especialmente fúngicas e bacterianas (HEYWORTH; CROSS; CURNUTTE, 2003).

1.7- Efeito de ROS nas infecções por *Leishmania*

O estudo de ROS em infecções causadas por parasitas do gênero *Leishmania* é pouco explorado na literatura, visto que há atribuição do óxido nítrico como principal molécula efetora na eliminação do parasita (EVANS, 1993b; YANG *et al.*, 1990). Estudos *in vitro* demonstraram papel irrelevante de ROS na eliminação de parasitas em macrófagos infectados por *L. major*. Macrófagos ativados por IFN- γ infectados eliminaram as formas amastigotas através da produção de •NO, mas não pela produção de O₂⁻ ou ONOO⁻ (ASSREUY *et al.*, 1994; BLOS *et al.*, 2003). Em estudos *in vivo*, camundongos deficientes Phox^{-/-} desenvolveram lesões semelhantes aos camundongos WT quando infectados com *L. major*. Estes animais deficientes na NADPH oxidase controlam a infecção por *L. major* no local da inoculação nos tempos iniciais, mas apresentam reativação da infecção após mais de 200 dias de infecção. Ainda, eles têm dificuldades em controlar a replicação do parasito nos linfonodos drenantes e baço, sugerindo a importância de ROS no controle do parasito *in vivo* em tempos tardios da infecção (BLOS *et al.*, 2003).

ROS também medeia resistência em infecções por via subcutânea causadas por *L. donovani* (BLOS *et al.*, 2003; CARTER *et al.*, 2005; MURRAY; NATHAN, 1999) porém estudos mostram que *L. guyanensis* é altamente susceptível

a espécies reativas de oxigênio (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006). Macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. guyanensis* não produzem $\bullet\text{NO}$, todavia, na presença dos parasitos ocorre a explosão respiratória intensa nestas células. Os altos níveis de ROS produzidos por estes macrófagos infectados são responsáveis pela eliminação do parasito induzindo sua morte através de um processo do tipo apoptose (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006). ROS estão provavelmente envolvidas na resistência à infecção por parasitos desta espécie já que camundongos quando tratados com apocinina, um inibidor da NADPH oxidase, são incapazes de realizar a explosão respiratória e não controlam a infecção quando comparados com os animais não tratados (HORTA *et al.*, 2012).

Essa diferença de resistência em algumas espécies pode ser explicada pela expressão diferenciada de sistemas antioxidantes. IFN- β induziu o aumento da expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) levando à diminuição da liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e, conseqüentemente, interferindo na eliminação de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (KHOURI *et al.*, 2009). Ainda, verificou-se que a carga parasitária, em macrófagos humanos infectados por essas espécies de *Leishmania*, aumentou de maneira dose dependente de IFN- β , mas independente da presença de $\bullet\text{NO}$ endógeno ou exógeno. Esta citocina reduziu significativamente a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ nestas células, sugerindo um possível envolvimento na eliminação dos parasitos independente de $\bullet\text{NO}$ mas dependente de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (KHOURI *et al.*, 2009).

Dados do nosso grupo mostraram que ROS não foram capazes de alterar a carga parasitária no sítio de infecção e linfonodo drenante, níveis de IFN- γ , IL-10 e óxido nítrico em animais infectados com *L. amazonensis* por via subcutânea. Porém foi observado um aumento no tamanho da lesão em animais deficientes em produção de ânion superóxido, o que nos leva a supor que ROS possuem um papel imunomodulatório na doença via inflamação. De fato, já foram atribuídos papéis inflamatórios de ROS em algumas infecções. Eles são capazes de ativar fatores de transcrição de genes inflamatórios como NF κ B e AP-1 (SCHMIDT *et al.*, 1995; SCHRECK; BAEUERLE, 1991) e também são responsáveis por induzir apoptose em neutrófilos e linfócitos T sob estresse oxidativo (PURUSHOTHAMAN; SARIN, 2009; SANMUN *et al.*, 2009; SPINNER *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2003). Há dados controversos na literatura em relação à atividade inflamatória ou anti-inflamatória de

ROS. Enquanto alguns trabalhos defendem indução da produção de citocinas e quimiocinas para recrutamento de células por ROS (HATTORI *et al.*, 2010), outros defendem que ROS teria papel anti-inflamatório por induzir a apoptose de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos (MARRIOTT *et al.*, 2008). Isso poderia acarretar diminuição do número de células no sítio de infecção bem como a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias.

O superóxido pode associar-se a outros íons para formar produtos ainda mais tóxicos como O_3 , HOCl, HOBr, $ONOO^-$, NO_2^+ , CO_3^{2-} , H_2O_2 e $OH^\bullet$ (HALLIWELL, 2006). Contudo, por apresentar carga negativa, o superóxido é incapaz de atravessar membranas biológicas. Dentre as moléculas citadas, o H_2O_2 se destaca por ser formado pela ação da SOD a partir de $O_2^{\bullet -}$ e, diferente deste, essa molécula atravessa a membrana do patógeno com facilidade e pode participar do extermínio gerando $OH^\bullet$ intracelular através da reação de Fenton (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1992; REPINE; FOX; BERGER, 1981). Assim, o próprio dano de enzimas com centro Fe-S aumenta a toxicidade de H_2O_2 por liberar Fe^{2+} . Por outro lado, a morte de microrganismos por meio da conversão de H_2O_2 em $OH^\bullet$ dentro do fagossomo (fora da membrana do patógeno) é improvável, pois, por ser extremamente reativa, essa molécula liberada no fagossomo pode reagir com muitos compostos, e se mesmo assim alguma delas atingir a parede celular de bactérias, por exemplo, causará danos irrelevantes. Em neutrófilos, para reduzir o dano causado pelo $OH^\bullet$ em moléculas próprias, a célula utiliza a lactoferrina, uma proteína que se liga ao íon ferro e evita a geração de $OH^\bullet$ pelo mecanismo de Fenton (SEGAL, 2005).

Outro processo que se destaca é a reação entre $\bullet NO$ e $O_2^{\bullet -}$, formando $ONOO^-$ que, em pH fisiológico e concentrações altas de CO_2 , como nos tecidos, pode formar, dentre outros, os radicais NO_2^+ e CO_3^{2-} com alto potencial de causar danos em microrganismos e em células hospedeiras (ALVAREZ; RADI, 2003). No entanto, as células de mamíferos parecem estar preparadas para tal agressão utilizando de diversas estratégias antioxidantes (EVANS; HALLIWELL, 2001).

Levando-se em consideração os neutrófilos, um mecanismo microbicida importante é a formação de ácido hipocloroso (HOCl) pela mieloperoxidase (MPO). Essa enzima compreende 2 a 5% de todas as proteínas da célula e através da fusão de grânulos citoplasmáticos com o fagossomo pode promover a morte de

microrganismos (WINTERBOURN, 2002). A enzima gera HOCl a partir de H_2O_2 e Cl^- , portanto alterações na capacidade de produção de superóxido possivelmente acarretam em menor atividade de MPO.

Pacientes com CGD apresentam grande quantidade de granulomas formados em vários órgãos do corpo, o que indica um alto processo inflamatório em andamento. Assim como citado anteriormente, animais deficientes da produção de ROS apresentam alta neutrofilia em algumas infecções experimentais e inflamação persistente. Esses fatos poderiam demonstrar um papel de ROS no controle da inflamação.

Um mecanismo proposto para a inflamação observada seria uma diminuição da degradação do material fagocitado pelas células. Este material poderia se acumular em fagócitos deficientes da produção de ROS levando a uma ativação celular persistente (SCHAPPI *et al.*, 2008). A atenuação da sinalização por Ca^{2+} dependente de ROS poderia estar impedida na CGD, o que contribuiria para um aumento da inflamação. Isso poderia ocorrer através da regulação do potencial de membrana em granulócitos CGD, os quais apresentam um potencial de membrana mais negativo e, conseqüentemente permitiria um aumento no influxo de Ca^{2+} . Esse aumento de Ca^{2+} intracelular levaria a um período maior de ativação da célula e, portanto, aumentaria a resposta inflamatória (GEISZT *et al.*, 1997; RADA *et al.*, 2003).

Têm sido descobertas cada vez mais funções de ROS na regulação de sinalização intracelular através da oxidação de resíduos de cisteína em fosfatases e fatores de transcrição (BEDARD; KRAUSE, 2007). Com isso, é possível que a ausência de NADPH oxidase possa levar a alterações na sinalização celular favoráveis às respostas pro-inflamatórias. Além do mais, há vários trabalhos demonstrando aumento da produção de $TNF-\alpha$ e IL-8 e diminuição da produção de $TGF-\beta$ e prostaglandina 2 em neutrófilos de pacientes com CGD (BROWN *et al.*, 2003; HATANAKA *et al.*, 2004; LEKSTROM-HIMES *et al.*, 2005).

Diferentes trabalhos sugerem que ROS podem induzir apoptose em neutrófilos (COXON *et al.*, 1996; GAMBERALE *et al.*, 1998; HIRAOKA *et al.*, 1998; KASAHARA *et al.*, 1997a; KOBAYASHI; DELEO, 2004; OTTONELLO *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2002). Conseqüentemente, foi sugerida uma diminuição de apoptose de neutrófilos como um mecanismo da hiperinflamação vista em CGD

(FADEEL *et al.*, 1998a; HAMPTON *et al.*, 2002; KASAHARA *et al.*, 1997a; VAN DE LOO *et al.*, 2003).

Devido aos diferentes papéis que as ROS podem desempenhar na regulação da resposta imune, como destacado anteriormente, e pela falta de dados na literatura ao relacionarmos estas espécies com as infecções por parasitos do gênero *Leishmania*, faz-se necessário um estudo para melhorar o entendimento destas interações no controle da infecção causada por *L. infantum*.

2- JUSTIFICATIVA

As espécies de *Leishmania* causadoras da leishmaniose visceral têm a capacidade de infectar camundongos, que são amplamente utilizados como modelos experimentais para estudar a interação genética do hospedeiro vertebrado, o controle da infecção e a regulação das respostas imunes. No entanto, grande parte dos estudos sobre a interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o parasita se concentra na espécie *Leishmania major*, que, embora relevante em outras regiões do mundo, não representa um problema significativo de saúde pública no Brasil. Portanto, é de grande importância ampliar o entendimento sobre outras espécies de *Leishmania*, como o *Leishmania infantum*, que é um agente infeccioso relevante no cenário epidemiológico brasileiro.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel crucial como mecanismos efetores na resposta imune contra patógenos intracelulares, sendo induzidas por *IFN- γ * ou por receptores do tipo toll. Nesse contexto, avaliar o papel das ROS em infecções por *Leishmania infantum* torna-se relevante para melhor compreender os mecanismos inflamatórios envolvidos na doença. Embora já existam estudos sobre o papel das ROS em outras infecções, a relação específica entre essas espécies reativas e as infecções por *Leishmania* ainda precisa ser mais explorada, especialmente no que diz respeito aos mecanismos imunológicos inflamatórios.

Ademais, a utilização de modelos experimentais que simulem de maneira mais fiel a infecção natural, como a infecção intradérmica, é importante, pois reflete com maior precisão os processos que ocorrem no ambiente natural do parasita. A falta de um maior aprofundamento nesse tipo de modelo experimental destaca a relevância de investigações que possam esclarecer o papel das ROS e seus efeitos nas respostas imunes durante a infecção por *Leishmania*.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar o papel das espécies reativas de oxigênio na infecção experimental por *Leishmania infantum*.

3.2 - Objetivos específicos

- Identificar as diferentes espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos infectados por *L. infantum*;
- Comparar a participação destes radicais na capacidade de eliminação de parasitos por macrófagos;
- Avaliar a carga parasitária em macrófagos *in vitro* influenciada pela produção de ROS;
- Comparar a carga parasitária nas orelhas de camundongos C57BL/6 selvagens, animais deficientes na NADPH oxidase ($\text{Phox}^{-/-}$) e deficientes na óxido nítrico sintase indutível ($\text{iNOS}^{-/-}$) infectados por via intradérmica com *L. infantum* nos tempos iniciais de estabelecimento da infecção;
- Comparar o perfil celular inflamatório da resposta inata nas orelhas de camundongos selvagens, $\text{Phox}^{-/-}$ e $\text{iNOS}^{-/-}$;
- Caracterizar os tipos celulares infectados no local do inóculo;
- Avaliar a produção de quimiocinas produzidas por ambas as linhagens de camundongos no local da infecção;

4 - MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 - Parasitos:

Foram usadas três diferentes cepas de *L. infantum*: promastigotas da cepa BH46 de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46), cedida gentilmente pela Prof. Dra. Maria Norma de Melo, do laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia da UFMG; promastigotas de uma cepa de *L. infantum* (Paciente MCAN / IT / 11/10545) recentemente isoladas de um cão com VL canina avançada de área endêmica de Nápoles na Itália, gentilmente cedida pelo Dr. Jesus G. Valenzuela (Laboratory of Malaria and Vector Research - National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA); promastigotas da cepa *L. infantum* RFP (do inglês Red Fluorescent Protein - Li-RFP), desenvolvida e cedida gentilmente pelo Dr. Alain Debrabant (Division of Emerging and Transfusion Transmitted Diseases, Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, EUA) (KIMBLIN *et al.*, 2008). As formas promastigotas foram cultivadas em Schneider® (Sigma S9895 - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co), 100 U de penicilina por mL e 100µg de estreptomicina por mL (Gibco BLR Life Technologies, cidade, estado, país). As culturas foram mantidas em estufa BOD a 25°C, e repicadas a cada quatro dias, até no máximo 10 repiques. Após a décima passagem, os parasitos foram novamente isolados de baços e fígados de camundongos knockout para o gene da citocina IFN- γ previamente infectados.

Para o isolamento de parasitos para cultura os animais foram sacrificados e seus órgãos macerados em salina tamponada com fosfato 10 mM em pH 7,3 (PBS), este conteúdo foi centrifugado a 50 x g a 4°C por 4 minutos. O sobrenadante foi recolhido em outro tubo e nova centrifugação feita (2.000 x g a 4°C por 15 minutos). Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso em 200µL de meio Schneider[®] completo (suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB), 2 mM de L-glutamina, 100U de penicilina por mL e 100µg de estreptomicina por mL) e transferido para o primeiro poço de uma placa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça). Posteriormente, foram transferidos 50µL do conteúdo do primeiro poço para o segundo poço e deste para o terceiro, e assim sucessivamente. A placa foi, então, selada e mantida em estufa BOD a 25°C. Após

sete dias, formas promastigotas de *Leishmania* foram recuperadas da placa e mantidas em garrafas de cultura de 25 cm³ (TPP).

4.2 - Camundongos

Matrizes de camundongos deficientes para genes da subunidade gp91 da enzima NAPH oxidase (C57BL/6.129S6-Cybb^{tm1Din}/J, aqui denominados Phox^{-/-}) e deficientes para o gene da enzima óxido nítrico sintase indutível (B6.129P2-Nos2^{tm1Lau}/J, iNOS^{-/-}), foram obtidos da Jackson Laboratories (Glensville, NJ, EUA). As colônias de criação foram mantidas em microisoladores dotados de filtro e ventilação no biotério de criação do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, UFMG. Os animais controles C57BL/6 são fornecidos pelo CEBIO (ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os animais experimentais foram mantidos sob condições de temperatura e fotoperíodo controladas, em espaço com barreiras ambientais. Foi oferecida ração convencional para camundongos (Labina, Purina, Paulínea, SP, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Camundongos fêmeas e machos com idade entre quatro a dez semanas foram utilizados nos experimentos (n=3 para todos os experimentos em cada repetição). Todos os procedimentos realizados com os camundongos estão em acordo com os protocolos éticos. Este projeto foi submetido para avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), sob o protocolo: 42 / 2013.

4.3 - Infecção *in vivo* com *L. infantum*

Foram utilizadas formas estacionárias das três cepas do parasito, obtidas com quatro dias de cultura. As culturas de *Leishmania* em fase estacionária foram centrifugadas a 2.000 x g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento suspenso em aproximadamente 1000µL de PBS. Uma alíquota foi retirada e diluída em formol tamponado e o número de parasitos foi estimado por contagem em câmara de Neubauer. A concentração foi acertada para 10⁶ parasitos em 10µL de PBS. A inoculação dos parasitos foi feita com seringa contendo uma agulha de calibre 26½ G através da orelha por via intradérmica.

4.4 - Eutanásia dos animais e retirada de órgãos

Os camundongos de cada grupo foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução anestésica contendo cloridrato de ketamina (Vertbrands, Jacareí, SP, Brasil) a 15 mg/mL e cloridrato de xilazina (Vertbrands) a 5 mg/mL. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Foram coletados órgãos desses animais para quantificação de parasitos, dosagem de quimiocinas e citometria de fluxo.

4.5 - Quantificação da carga parasitária

A quantificação de parasitos foi realizada pela técnica de diluição limitante, em que diluições sucessivas foram feitas a partir dos homogenatos dos baços, fígados e orelhas dos camundongos experimentais infectados. Primeiramente os órgãos, inteiros, foram macerados em um homogeneizador de tecidos estéril. O homogenato foi centrifugado a 50 x *g* por 4 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Esse sobrenadante foi centrifugado a 2000 x *g* por 15 minutos. O sedimento foi suspenso em 200µL de meio Schneider[®] completo. Em uma placa estéril de poliestireno com 96 poços e fundo chato (TPP), foram colocados 150 µL/poço de meio Schneider[®] completo, exceto na primeira coluna de poços, onde foi colocada 200µL da suspensão do órgão macerado. Em seguida, foram feitas diluições sucessivas 1:4, tomando-se o cuidado de trocar o conjunto de ponteiros da pipeta multicanal a cada diluição para evitar o arraste de parasitos e um consequente resultado falso-positivo. As placas foram mantidas a 25°C em estufa BOD e a leitura dos resultados foi feita entre 7 e 10 dias após o início da cultura.

4.6 - Obtenção de macrófagos derivados de monócitos de medula óssea e infecção *in vitro* por formas amastigotas de *L. infantum*

As células da medula óssea foram obtidas a partir do lavado do fêmur e tíbia dos camundongos C57BL/6 WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} com PBS complementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO). Para diferenciação de macrófagos derivados de monócitos da medula óssea (BMDM), estas células foram incubadas em placa de petri (Prolab, Osasco, SP, BR) por nove dias em meio DMEM F12 (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Nutricell), 100

U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L929, que produzem o fator M-CSF. Após quatro dias em cultura adicionamos mais 5 mL do meio DMEM F12 (GIBCO) e depois de 3 dias descartamos 5 mL do sobrenadante da cultura e adicionamos mais 5mL de meio novo. Finalmente, após nove dias em cultura, os macrófagos foram removidos da placa com PBS gelado e então plaqueados na concentração de 5×10^5 células por poço em lâminas Lab –Tek™ (NUNC, Rochester, NY, EUA) de 8 poços. Após o plaqueamento, os macrófagos foram incubados em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂ por 16 horas. Após esse período as células não aderentes foram removidas por lavagem dos poços com PBS aquecido a 37°C, procedimento repetido por três vezes. Novo meio DMEM F12 completo foi adicionado, agora sem o fator L929, assim como os estímulos: 100U de IFN-γ (Sigma Aldrich) e 100 ng/mL de LPS (InvivoGen, São Diego, CA, EUA). Após 4 horas na presença destes estímulos, foi feita a infecção *in vitro* destas células nas seguintes proporções: 1 macrófago para 10 promastigotas de *L. infantum*. Após 4h de infecção os parasitos que não foram internalizados foram lavados três vezes com PBS a 37°C e o meio foi repostado. As lâminas de quatro horas e de 72 horas de infecção foram então fixadas com metanol e coradas com o kit de coloração hematológica Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Em seguida, lamínulas foram afixadas em lâminas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e contadas em microscópio óptico. Foram contados 300 macrófagos por poço e avaliados a porcentagem de macrófagos infectados e o número de parasitos por macrófago infectado.

4.7- Produção *in vitro* de espécies reativas de oxigênio (ROS) e dosagem de nitrito

4.7.1- Superóxido:

Nesse ensaio, foram usadas placas de 96 poços opacas (NUNC). Em cada poço foram colocados 5×10^5 macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} em meio RPMI completo sem vermelho de fenol (Gibco). Os estímulos foram: promastigotas de *L. infantum*, 10 parasitos por célula e zymosan A (Sigma-Aldrich) em uma proporção de 10 partículas por célula. Em cada

poço foi adicionado o luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) (Sigma-Aldrich) numa concentração de 0,05 mM. A placa foi colocada num luminômetro (Packard, Waltham, MA, EUA), que mede a intensidade da luz produzida. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi medida por duas horas, em intervalos de dois minutos entre cada medição. A detecção de radicais de oxigênio é feita pela reação do luminol com as espécies reativas de oxigênio produzindo luz. Em um primeiro passo, o luminol é reduzido por moléculas reativas, como $\text{OH}^\bullet$, H_2O_2 ou ONOO^- , que atacam sua ligação dinitrogênica adicionando mais dois oxigênios a um dos anéis, e depois é capaz de combinar com o $\text{O}_2^\bullet$ e produzir luz. Essa forma de radiação é captada pelo luminômetro é representada como unidades relativas de luz (RLU, em inglês) por segundo.

4.7.2 - Peróxido de Hidrogênio:

Nesse ensaio, foram usadas placas de 96 poços pretas e opacas de fundo chato (Microfluor 1, NUNC). Em cada poço foram colocadas 5×10^5 macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT, $\text{Phox}^{-/-}$ e $\text{iNOS}^{-/-}$ em tampão fosfato de Ringer que consiste de NaCl 145 mM, fosfato de sódio 5,7 mM, KCl 4,86 mM, CaCl_2 0,54 mM, MgSO_4 1,22 mM e glicose 5,5 mM, pH 7,35, a 37°C. Os estímulos foram: IFN- γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) quatro horas antes da infecção com promastigotas de *L. infantum*, 10 parasitos por célula, ou adição de zymosan A (Sigma-Aldrich) em uma proporção de 10 partículas por célula. Apocinina foi adicionada às culturas de células 30 minutos antes da adição dos parasitos. Utilizamos Amplex[®] red (Invitrogen, San Diego, CA, EUA) para detecção de peróxido de hidrogênio, produzido durante uma hora e trinta minutos de experimento, seguindo todos os procedimentos de acordo com as instruções do fabricante. A leitura das placas foi feita utilizando-se Fluorímetro SpectraMax Gemini XPS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), no comprimento de onda de excitação entre 530 – 560 nm e emissão em 590 nm.

4.7.3 - Dosagem de nitrito:

A quantidade de óxido nítrico produzida em culturas de macrófagos foi estimada a partir da dosagem de nitrito nos sobrenadantes de culturas de macrófagos

(48 horas) estimuladas ou não com IFN- γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) por uma noite e infectadas ou não com *L. infantum* por 4 horas *in vitro* pelo método de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Para as dosagens em sobrenadante, as amostras foram colocadas em uma placa de 96 poços (TPP), 50 μ L de amostra/poço. O padrão de nitrito de sódio (250 mM) foi adicionado em duplicata e diluído 1:2 nos poços posteriores em meio RPMI. O branco consiste apenas de RPMI completo. Logo após foram adicionados 100 μ L de solução de Griess sobre as amostras, o padrão e o branco. A placa foi mantida no escuro por 10 minutos e a densidade ótica foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System, modelo SPECTRAmax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

4.7.4 - Peroxinitrito:

Nesse ensaio foram usadas placas de 96 poços pretas e opacas de fundo chato (Microfluor 1, Thermo Scientific). Em cada poço foram colocadas 5x10⁵ macrófagos derivados de medula óssea de camundongos WT, Phox-/- e iNOS-/- em meio RPMI completo sem vermelho de fenol (Gibco). Os estímulos foram: IFN- γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) quatro horas antes da infecção com promastigotas de *L. infantum*, 10 parasitos por célula e adição de zymosan A (Sigma-Aldrich) em uma proporção de 10 partículas por célula. Catalase, superóxido dismutase-PEG, L-NAME (N ω -Nitro-L-arginina cloridrato de éster metil) e apocinina (todos provenientes da Sigma-Aldrich) foram adicionados às culturas de células 30 minutos antes da adição dos parasitos. Para a detecção da produção de peroxinitrito em culturas de macrófagos utilizamos a sonda ácido borônico cumarina (CBA), que reage direta e rapidamente com o peroxinitrito ($k = 1,1 \mu\text{M/s}$). O peroxinitrito oxida CBA estequiometricamente em uma proporção de 1:1 em um produto fluorescente que pode ser analisado a uma excitação de 332 nm e de emissão de 400 nm (ZIELONKA *et al.*, 2012). A leitura das placas foi feita utilizando-se Fluorímetro SpectraMax Gemini XPS (Molecular devices, Sunnyvale, CA, EUA).

4.8 - Citometria de fluxo

4.8 - Citometria de fluxo

Orelhas de camundongos C57BL/6 WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* foram coletadas após 6, 12, 24, 48 e 72 horas de infecção com formas metacíclicas de *L. infantum* RFP. As folhas dorsais e ventrais de cada orelha foram separadas e incubadas por 1h 30min em 750µL de meio RPMI contendo 62,5 µg/mL de Liberase TL (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), 0,5 mg/mL de desoxiribonuclease I (Sigma Aldrich), 24 mM de NaHCO₃, 10 mM de HEPES (Sigma Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich), 50 µM de β-mercapto-etanol (Sigma Aldrich), 50 U de penicilina por mL e 50 µg de estreptomicina por mL (GIBCO). A digestão foi interrompida adicionando-se mais 750µL de RPMI 10% SFB por amostra e EDTA 0,5M diluído 1:100 (pH 8). As amostras foram então maceradas, centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C e o precipitado foi diluído em meio RPMI com 10% de SFB. Posteriormente, os precipitados das amostras foram incubados por 20 minutos a 4°C com anticorpo anti Fc-γ III/II CD16/32 (clone 2.4G2) e os seguintes marcadores de superfície: anti-Ly6G (clone 1A8); anti-Ly6C (clone HK1.4); anti-F4/80 (clone BM8) (eBioscience, San Diego, CA, USA); anti-CD11c (clone HL3); anti-MHC II (clone M5/114,15,2); anti-CD11b (clone M1/70) (eBioscience, San Diego, CA, USA). Foi utilizado, também, o kit para avaliação de viabilidade celular LIVE/DEAD (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) seguindo as especificações do fabricante. Exceto quando especificado o contrário, todos os anticorpos utilizados foram da BD (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Nos experimentos para avaliação de apoptose e necrose foram utilizados ainda anexina V e 7-AAD (Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida adicionamos 1 mL de PBS a 4°C e as amostras foram centrifugadas a 400 x g por 10 minutos a 4°C para remoção de excesso de anticorpos. As amostras foram adquiridas logo em seguida. As células foram adquiridas usando o citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Bioscience). As análises foram realizadas no software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

4.9 - Detecção de quimiocinas por ELISA

Os níveis de CXCL1, CXCL2 e CCL2 foram medidos nas orelhas de camundongos C57BL/6 WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* não infectados e daqueles infectados com *L. infantum* nos tempos de 10 e 24 horas após a infecção. Todos os anticorpos

foram obtidos da R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), e utilizados segundo as recomendações do fabricante. As placas de ELISA (Nalgene NUNC, Rochester, NY, EUA) foram cobertas com os anticorpos de captura desenvolvidos em cabra anti-CXCL1, anti-CXCL2 diluídos em tampão de revestimento (8,4 g/L de NaHCO_3 , 5,8 g/L de NaCl em água destilada; pH 9,6) em um volume total de 100 μL /poço nas concentrações definidas pelo manual do fabricante. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas, e após tal período as placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com albumina bovina 1% (BSA) em PBS por 1 hora em temperatura ambiente em um volume de 200 μL /poço. Após o bloqueio, as placas foram lavadas e as amostras e os padrões foram diluídos em solução diluente (BSA 0,1% e Tween 20 0,1% em PBS, pH 7,4), e adicionados às placas em um volume total de 100 μL /poço. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C, e no dia seguinte as mesmas passaram por um novo ciclo de lavagem, após o qual anticorpos de detecção biotinilados produzidos em cabra foram adicionados na concentração definida pelo manual do fabricante em solução diluente num volume de 100 μL /poço e incubados à temperatura ambiente por 2 horas. Após esse período de incubação e novo ciclo de lavagem, estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionada à placa na proporção 1:4000 em solução diluente num volume de 100 μL /poço e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. A placa foi lavada novamente e adicionou-se a solução do substrato o-fenileno-diamina (OPD, Sigma Aldrich) a 0,4 mg/mL e H_2O_2 a 0,005% em tampão citrato-fosfato (0,15M, pH 5,0) acompanhando-se a formação da cor. A reação foi interrompida após 15 a 20 minutos de incubação com 50 μL /poço de H_2SO_4 1M. A leitura das placas foi feita a 492 nm em espectrofotômetro. A sensibilidade do ensaio foi de 16 pg/mL para CXCL1 e CXCL2.

4.10 - Análise histopatológica

As orelhas dos animais C57BL/6 WT e $\text{Phox}^{-/-}$ infectadas foram removidas e fixadas em formalina tamponada com fosfato a 10% (pH 7,2), desidratadas e posteriormente diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes histológicos seriados de 5 μm de espessura em micrótomo de rotação SPENCER (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), os quais foram montados em

lâminas e corados segundo as técnicas de Hematoxilina-Eosina. As análises histológicas foram desenvolvidas sob microscopia de luz usando de 100 a 400 vezes de aumento.

Para análise de imunohistoquímica visando marcar a *Leishmania* nas lesões as lâminas ficaram por uma hora na estufa a 57°C para que o excesso de parafina fosse removido antes do ensaio. No primeiro dia do ensaio as lâminas foram passadas em Xilol I, II e III (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), 20 minutos em cada, para garantir remoção completa da parafina. Em seguida passaram por um processo de desidratação: álcool absoluto (I, II e III) e álcool 90%, 80% e 70%. As lâminas ficaram por cinco minutos em cada solução. Em seguida foram lavadas por três vezes em PBS para a retirada do álcool; cada lavagem foi feita em imersão por cinco minutos. Em seguida foram realizados os três bloqueios da reação. O primeiro deles realizado em imersão, com solução de PBS 10% de peroxidase, por 30 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens de cinco minutos cada em PBS. O segundo bloqueio foi feito com solução de soro albumina 2% (Sigma-Aldrich), por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas, uma vez, em PBS por cinco minutos. Por fim, foi realizado o bloqueio com solução de PBS a 0,2% de soro albumina, 5% de soro normal de cabra, por 30 minutos. Após este bloqueio as lâminas não foram lavadas, apenas enxugamos o excesso de solução ao redor dos cortes. Em seguida adicionamos o soro de coelho previamente infectado com *L. infantum* 1:800. As lâminas foram deixadas em câmara úmida escura por 12 horas a 4°C. No dia seguinte lavamos as lâminas por três vezes em PBS, cinco minutos cada lavagem, para a retirada do anticorpo não ligado. Em seguida acrescentamos sobre o corte os reagentes do kit DAKO (DAKO North America, Inc, Carpinteria, CA, EUA). Primeiro foi acrescentada a estreptoavidina-HRP, que permaneceu sobre o corte por 30 minutos, seguida de lavagem com PBS por três vezes, e por fim o anticorpo biotinilado, incubado por 30 minutos em câmara escura e úmida. Em seguida as lâminas passaram por outro processo de lavagem. Por fim, fizemos a revelação com PBS contendo 50 mg de DAB e 0,25% de H₂O₂. Após cinco minutos mergulhamos rapidamente as lâminas em solução de hematoxilina e lavamos em água corrente. Por fim, nova lavagem em PBS foi realizada para remoção de excesso de corante. Em seguida as lâminas foram desidratadas na sequência de álcool: 70, 80, 90%; e três banhos em álcool absoluto; por cinco minutos nos primeiros

e 10 minutos em cada absoluto. Em seguida foram passadas em três banhos de xilol, por 10 minutos em cada. Por fim montamos as lâminas com entelan (Merck). A quantificação da carga parasitária foi feita a partir de análise semi-quantitativa da intensidade de parasitas nas diferentes linhagens, considerando 1 – ausente, 2 – discreto, 3 – moderado e 4 – intenso. As mesmas foram obtidas com magnitude de 40x através do microscópio Optical Olympus Research (Center Valley, PA, EUA) acoplado a um sistema de captura de imagem digital (MegaCybernetics, Center Valley, PA, EUA). As imagens foram analisadas com o software KS300 (Kontron Elektronik/Carl Zeiss, NY, EUA).

4.11 - Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (EP) para cada grupo. Nos ensaios de cinética de produção de citocinas foi realizado o teste Two-Way ANOVA, seguido de Bonferroni para determinar diferenças entre os tempos e os grupos avaliados. Para determinar diferenças entre dois grupos, foi utilizado o teste *t* de Student. Em alguns experimentos foi utilizado teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 - RESULTADOS

5.1 - Interação de macrófagos com *Leishmania infantum*

5.1.1 - Promastigotas de *L. infantum* induzem a produção de $O_2^{\cdot-}$ pela NADPH oxidase de macrófagos

Um dos mecanismos de eliminação de parasitos intracelulares é a produção de ROS pela célula hospedeira ativada. Assim, buscamos verificar se *L. infantum* teria a capacidade induzir a produção de ROS em macrófagos infectados *in vitro*. Para caracterizar a produção de $O_2^{\cdot-}$ por macrófagos, realizamos experimentos de quimioluminescência usando luminol. Dessa forma, 10^6 macrófagos derivados de medula de camundongos WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* foram infectados com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* de cultura em fase estacionária, estimulados com Zymosan (fragmento particulado de *Sacharomyces cerevisiae* indutor de fagocitose e liberação de ROS) ou cultivados sem estímulo. As cinéticas de produção de $O_2^{\cdot-}$ mostram que macrófagos não estimulados não produzem quantidades detectáveis de $O_2^{\cdot-}$. Quando infectados com *L. infantum*, macrófagos de camundongos WT e *iNOS^{-/-}* apresentaram pico na produção de $O_2^{\cdot-}$ após 40 minutos de contato com os parasitos (Figura 5 A, B e C). O mesmo se repete em relação aos macrófagos *iNOS^{-/-}*. E, evidentemente, macrófagos *Phox^{-/-}* não apresentam produção de ROS (Figura 5 D). A Figura 5 E representa a área sob a curva de macrófagos WT estimulados ou não com IFN- γ e LPS. Apenas o estímulo com IFN- γ e LPS não foi capaz de promover a produção de $O_2^{\cdot-}$. No entanto, ao adicionarmos as formas promastigotas do parasito à cultura destes macrófagos, ocorreu maior produção desse radical quando comparado com a produção de macrófagos não estimulados e infectados ($P < 0.0001$). A adição de apocinina, inibidor da NADPH oxidase, aboliu completamente a produção de $O_2^{\cdot-}$. Desta forma fica evidente que as formas promastigotas de *L. infantum* induziram produção de $O_2^{\cdot-}$ pela NADPH oxidase de macrófagos.

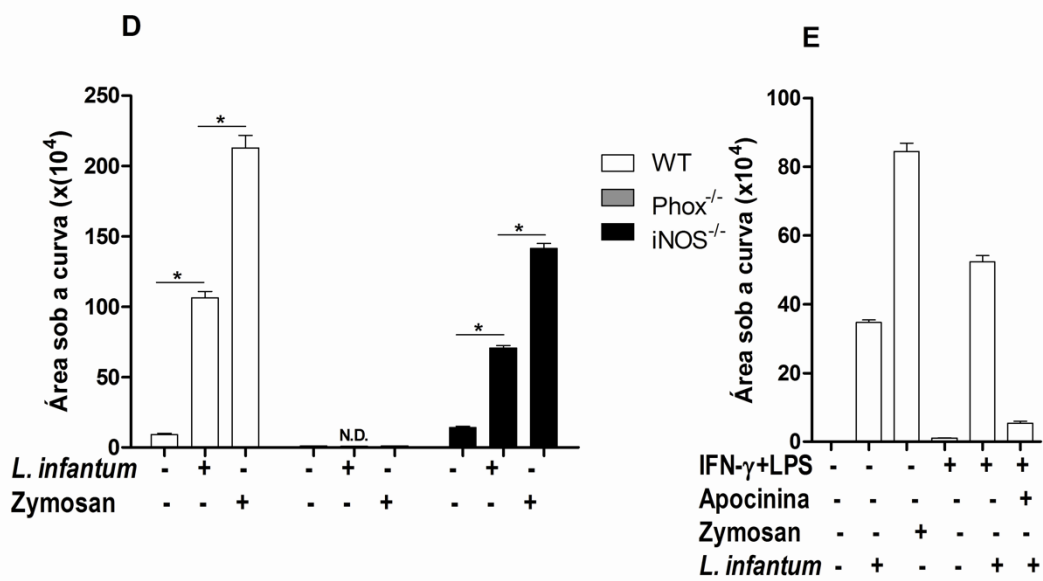
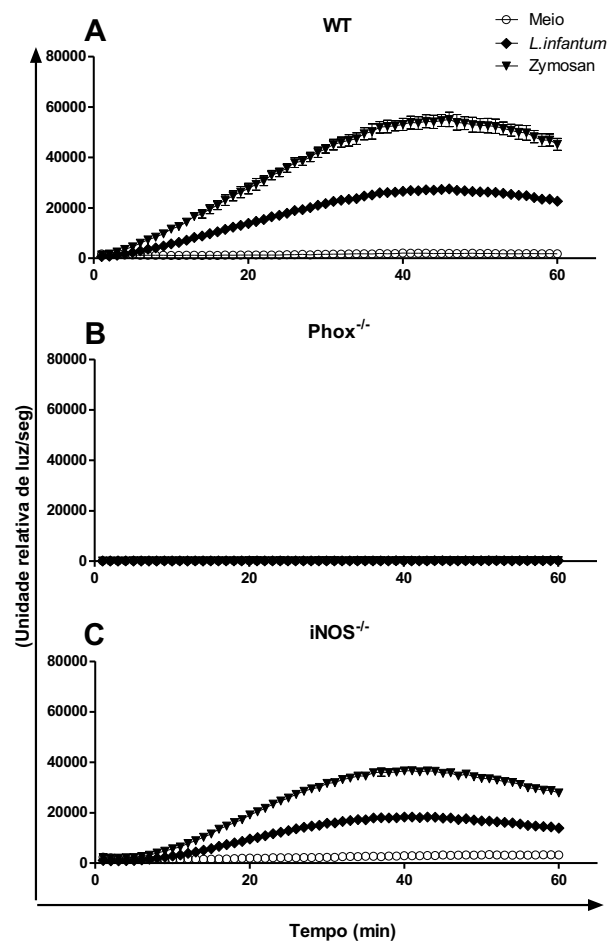


Figura 5: Produção de $O_2^{\cdot-}$ por NADPH oxidase de macrófagos de camundongos WT, $Phox^{-/-}$ e $iNOS^{-/-}$. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 WT, $Phox^{-/-}$ e $iNOS^{-/-}$ (10^6 por poço) permaneceram sem estímulo, foram estimulados com Zymosan, ou infectados com 10^7 promastigotas de *L. infantum* de cultura em fase estacionária. Cinética de produção de $O_2^{\cdot-}$ (A, B e C). Representação gráfica em barra da produção de $O_2^{\cdot-}$ considerando a área abaixo das curvas (D). Macrófagos de camundongos C57BL/6 WT foram estimulados ou não com 100 U/mL de IFN- γ e 100ng de LPS. 300 μ M de apocinina foi usada para inibir a ativação da NADPH oxidase e a produção de $O_2^{\cdot-}$ foi representada por gráfico de barras (E). Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão são de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA two-way) * indica $P<0,05$.

5.1.2 - Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos infectados com *L. infantum*

A geração de ROS por macrófagos é um processo que envolve uma cascata de eventos que se iniciam com a produção de $O_2^{\cdot-}$ que pode ser convertido em H_2O_2 tanto espontaneamente, especialmente em níveis baixos de pH, ou através de um mecanismo dependente da enzima superóxido dismutase (KLEBANOFF, 1980; SCANDALIOS, 2002). Estudos *in vitro* demonstraram o efeito leishmanicida do peróxido de hidrogênio de maneira dose-dependente em promastigotas de *L. donovani*, *L. infantum* e *L. tropica* (VAN *et al.*, 2011). Em nossos experimentos anteriores mostramos que a infecção com *L. infantum* induziu a produção de $O_2^{\cdot-}$ e assim decidimos avaliar os níveis de H_2O_2 nestas culturas utilizando Amplex® Red. Para avaliar a produção de H_2O_2 macrófagos de camundongos WT foram estimulados ou não com IFN- γ e LPS e infectados com *L. infantum*. As culturas de macrófagos somente em meio de cultura ou ativados com IFN- γ e LPS produziram níveis relativamente muito baixos de H_2O_2 . A infecção com os parasitos, no entanto, induziu a formação de H_2O_2 oito vezes superior no sobrenadante das culturas de macrófagos tratados ou não. Houve uma considerável redução nos níveis de H_2O_2 acumulados no sobrenadante das culturas onde apocinina foi adicionada.

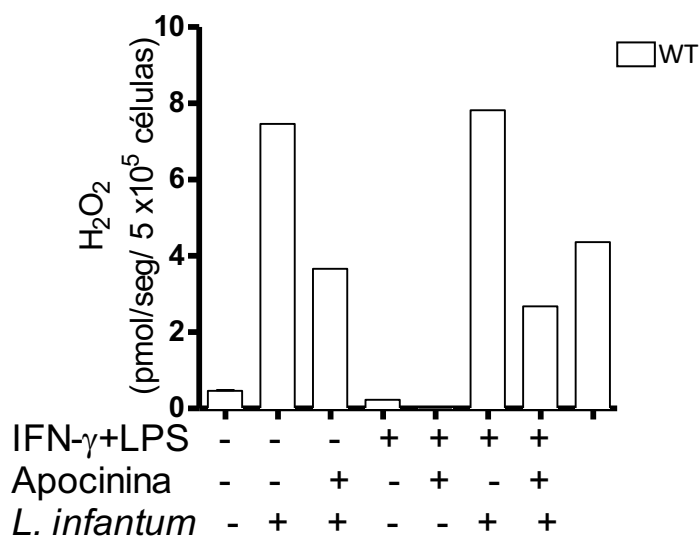


Figura 6: *L. infantum* induz a formação de H₂O₂ por macrófagos de camundongos WT. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 WT (5x10⁵ por poço) permaneceram sem estímulo, ou foram estimulados com IFN-γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) por quatro horas. Apocinina (300μM) foi adicionada 30 minutos antes dos macrófagos serem infectados com 5x10⁶ de promastigotas de *L. infantum* de cultura em fase estacionária. A detecção dos níveis de H₂O₂ no sobrenadante das culturas foi feito pela utilização de Amplex[®] Red seguindo as instruções do fabricante. Os dados mostrados como média ± desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). Análise estatística feita por análise de variância (ANOVA two-way).

5.1.3 - Produção de NO por macrófagos infectados por *L. infantum*.

Além da capacidade de produzir ROS os macrófagos podem produzir NO, através da expressão da enzima óxido nítrico sintase indutível, como importante mecanismo envolvido na eliminação de vários parasitos intracelulares (FERRARI *et al.*, 2011). Como os macrófagos Phox^{-/-} são deficientes na produção de O₂⁻ durante a fagocitose, nos questionamos se a falta deste radical nestes macrófagos resultaria em um aumento da produção de NO como uma forma de compensação pela falta de uma estratégia para a eliminação da *L. infantum*. Para avaliar esta questão buscamos determinar a produção de NO por macrófagos derivados de medula de camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-}, infectados com *L. infantum* de cultura em fase estacionária *in vitro* e estimulados ou não com IFN-γ e LPS. Utilizamos o método de Griess para detecção de nitrito no sobrenadante das culturas após 48 horas da infecção. Como

mostrado no gráfico da figura 7, a ativação de macrófagos por IFN- γ e LPS foi suficiente para induzir quantidades semelhantes de nitrito nos sobrenadantes de culturas de macrófagos WT e *Phox*^{-/-}. Observa-se que somente a *L. infantum* não induziu acumulação de nitrito no sobrenadante nestas culturas. No entanto, a *L. infantum* não alterou a produção de nitrito quando houve a ativação prévia dos macrófagos com IFN- γ e LPS. Como esperado não houve detecção de nitrito no sobrenadante das culturas de macrófagos deficientes na expressão da enzima iNOS.

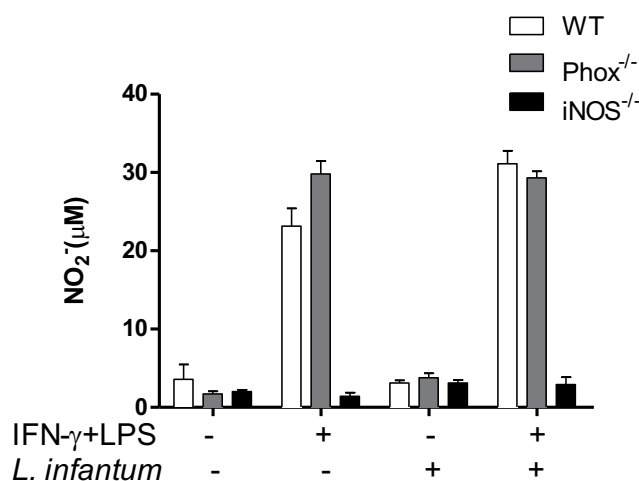


Figura 7: Produção de NO por macrófagos de camundongos WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-}. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} (1×10^6 por poço) permaneceram sem estímulo, ou foram estimulados com IFN- γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) por uma noite, ou infectados com 1×10^7 de promastigotas de *L. infantum* de cultura em fase estacionária. O sobrenadante das culturas foi coletado após 48 horas da infecção e usados para medição dos níveis de nitrito pelo método de Greiss. Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 3 ($n=3$ por grupo em cada experimento). Análise estatística feita por análise de variância (ANOVA two-way).

5.1.4 - Promastigotas de *L. infantum* induzem formação de peroxinitrito em macrófagos estimulados por IFN- γ e LPS

A formação concomitante de $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot NO$ durante a infecção *in vitro* por promastigotas de *L. infantum* faz com que seja esperado que ocorra a formação de peroxinitrito, já que estes dois radicais reagem entre si a uma velocidade de difusão controlada ($k \sim 10^{10} M^{-1} s^{-1}$) (ZIELONKA *et al.*, 2012). Uma vez formado, o peroxinitrito poderia difundir e reagir com moléculas alvo do parasito e atuar como mais um mecanismo efetor aliado na eliminação do parasito. Para investigar a possível formação de $ONOO^-$ induzida pela *L. infantum*, primeiramente macrófagos derivados de medula de camundongos WT foram estimulados ou não com IFN- γ e LPS por quatro horas, seguidos de adição de L-NAME, apocinina, catalase ou superóxido dismutase meia hora antes da infecção e, então, infectados com *L. infantum* de cultura em fase estacionária *in vitro*. A falta do estímulo de IFN- γ e LPS não gerou níveis significativos de $ONOO^-$ mesmo quando os macrófagos foram infectados com *L. infantum* (Figura 8A, B e C). Somente na presença de IFN- γ e LPS os macrófagos foram capazes de produzir maiores quantidades de $ONOO^-$. Houve um aumento na produção de $ONOO^-$ quando estes macrófagos foram infectados com *L. infantum*. Nos macrófagos estimulados com IFN- γ e LPS e infectados com *L. infantum*; a adição de L-NAME foi responsável pela drástica redução na produção de $ONOO^-$. Já a presença da apocinina reduziu a produção de $ONOO^-$ para níveis comparáveis aos de macrófagos estimulados com IFN- γ e LPS (Figura 8A). Como a sonda CBA pode reagir com H_2O_2 , a presença da catalase na cultura retiraria do sistema o H_2O_2 produzido, podendo afetar o resultado obtido. No entanto, não houve alteração na produção de $ONOO^-$ nesta condição. Ainda, como o parasito induziu a produção de superóxido e este pode ser convertido em H_2O_2 , adicionamos superóxido dismutase a fim de aumentar tal reação. Assim como a catalase, a adição de superóxido dismutase não afetou a oxidação da sonda (Figura 8B). Desta forma, foi possível demonstrar que, nas nossas condições, a sonda CBA detectou a produção de peroxinitrito, induzida pela infecção com *L. infantum* em macrófagos WT ativados, e não de peróxido de hidrogênio. A produção de peroxinitrito foi dependente principalmente da presença de $\cdot NO$. A seguir, buscando confirmar os resultados obtidos anteriormente, usamos

macrófagos de camundongos $\text{Phox}^{-/-}$ e $\text{iNOS}^{-/-}$. Mais uma vez a produção de peroxinitrito foi maior em macrófagos WT estimulados com IFN- γ e LPS e infectados com *L. infantum* em comparação com macrófagos $\text{Phox}^{-/-}$ e $\text{iNOS}^{-/-}$ (Figura 8C).

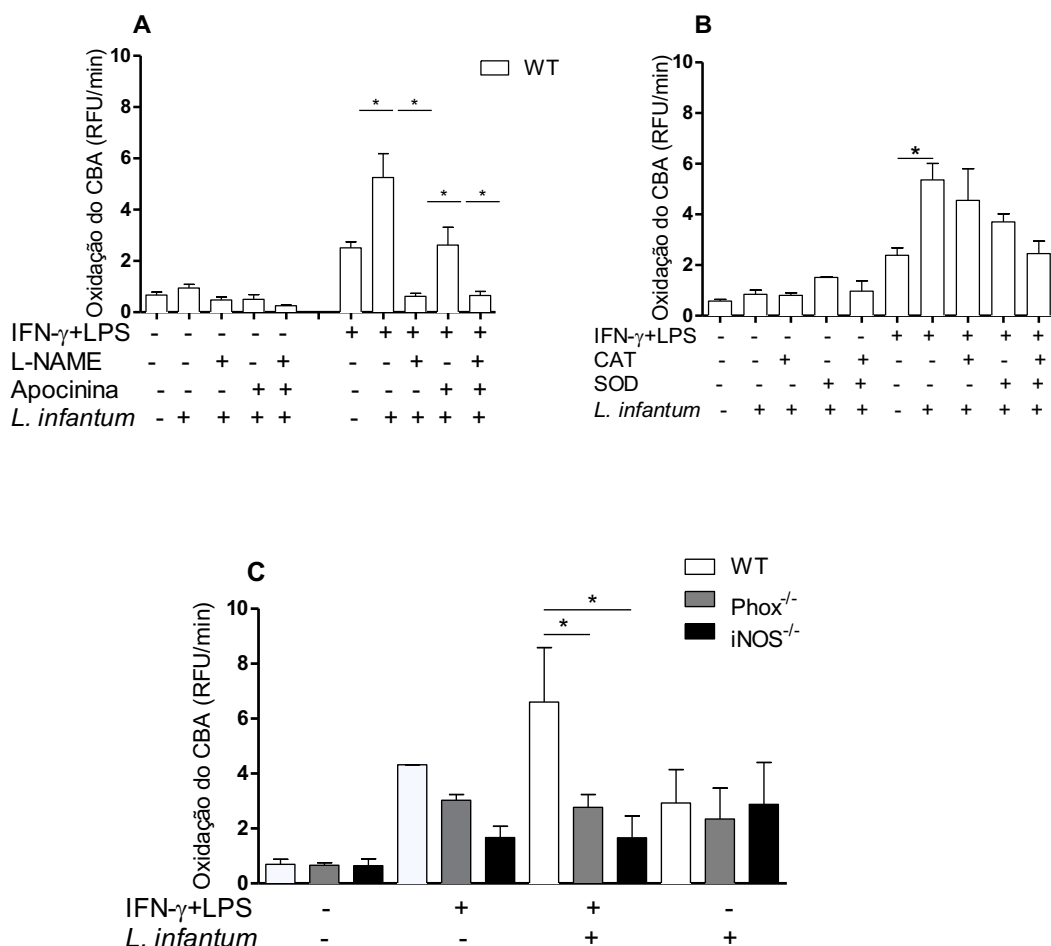


Figura 8: Detecção de ONOO⁻ em macrófagos induzida por promastigotas de *L. infantum*. Macrófagos derivados de medula de camundongos C57BL/6 WT, $\text{Phox}^{-/-}$ e $\text{iNOS}^{-/-}$ (10^6 por poço) permaneceram sem estímulo, ou foram estimulados com IFN- γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) por quatro horas. Catalase (1000U/mL), superóxido dismutase (100U/mL), L-NAME (0,5mM), apocinina (300 μ M) e CBA (100 μ M) foram adicionados 30 minutos antes dos macrófagos serem infectados com 1×10^7 de promastigotas de *L. infantum* de cultura em fase estacionária. A detecção da oxidação da sonda CBA foi seguida por uma hora e 30 minutos. Valores da linha de tendência de cada curva foram usados como referência da oxidação da sonda. Dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de quatro ($n=3$ por grupo em cada experimento). Análise estatística feita por análise de variância (ANOVA two-way). * indica $P<0,05$.

5.1.5 - Macrófagos de camundongos C57BL/6 WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} apresentam diferenças no perfil de produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pós infecção por *L. infantum*.

Os dados apresentados anteriormente demonstraram claramente que os macrófagos ativados com IFN- γ e LPS e infectados com *L. infantum* produziram reativos de oxigênio mostrados resumidamente na tabela abaixo.

Tabela 1: Resumo das espécies reativas produzidas por macrófagos

	IFN- γ + LPS	<i>L. infantum</i>	IFN- γ + LPS + <i>L. infantum</i>
O ₂ ^{•-}	-	+	+
H ₂ O ₂	-	+	+
•NO	+	-	+
ONOO ⁻	+	+	+

Diante deste cenário de explosão respiratória induzido pela *L. infantum*, decidimos avaliar as consequências da presença destes diferentes radicais na capacidade de eliminação dos parasitos. Nestes experimentos, BMDM de camundongos WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} foram infectados com dez formas promastigotas de *L. infantum* de cultura em fase estacionária e estimulados ou não com IFN- γ e LPS. Assim, determinamos a porcentagem de macrófagos que apresentavam parasitos em seu interior e o número de parasitos por macrófago infectado. Como visto na figura 5A, macrófagos de camundongos WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} infectados não apresentaram diferenças na capacidade de fagocitar o parasito após quatro horas de infecção. Não houve diferenças na porcentagem de macrófagos infectados (Figura 9A) e nem no número de parasitos por macrófago infectado (Figura 9C) entre as três linhagens de macrófagos, independente de seu estado de ativação, indicando que a presença dos radicais não interfere na habilidade fagocítica dos macrófagos. Após 72 horas de infecção, os macrófagos de camundongos WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-}, ativados com IFN- γ e LPS, foram capazes de eliminar os parasitos. A porcentagem de macrófagos WT

infectados reduziu para 1,38%, já nos macrófagos deficientes na produção de $O_2^{\cdot-}$ a porcentagem reduziu para 4,30% e nos macrófagos deficientes na produção de $\bullet NO$ reduziu para 12,49%. Porém, os macrófagos WT e *iNOS*^{-/-} que não foram ativados não apresentaram redução comparável a dos macrófagos ativados. Já os macrófagos *Phox*^{-/-} não ativados não apresentaram diminuição da porcentagem de infecção (Figura 9B). Estes resultados mostram que nos macrófagos dos camundongos WT a produção de ROS foi importante para reduzir a porcentagem de infecção, mesmo na ausência de ativação por IFN- γ . Nossos dados mostram ainda que os macrófagos deficientes na produção de ROS foram mais permissivos ao parasitismo.

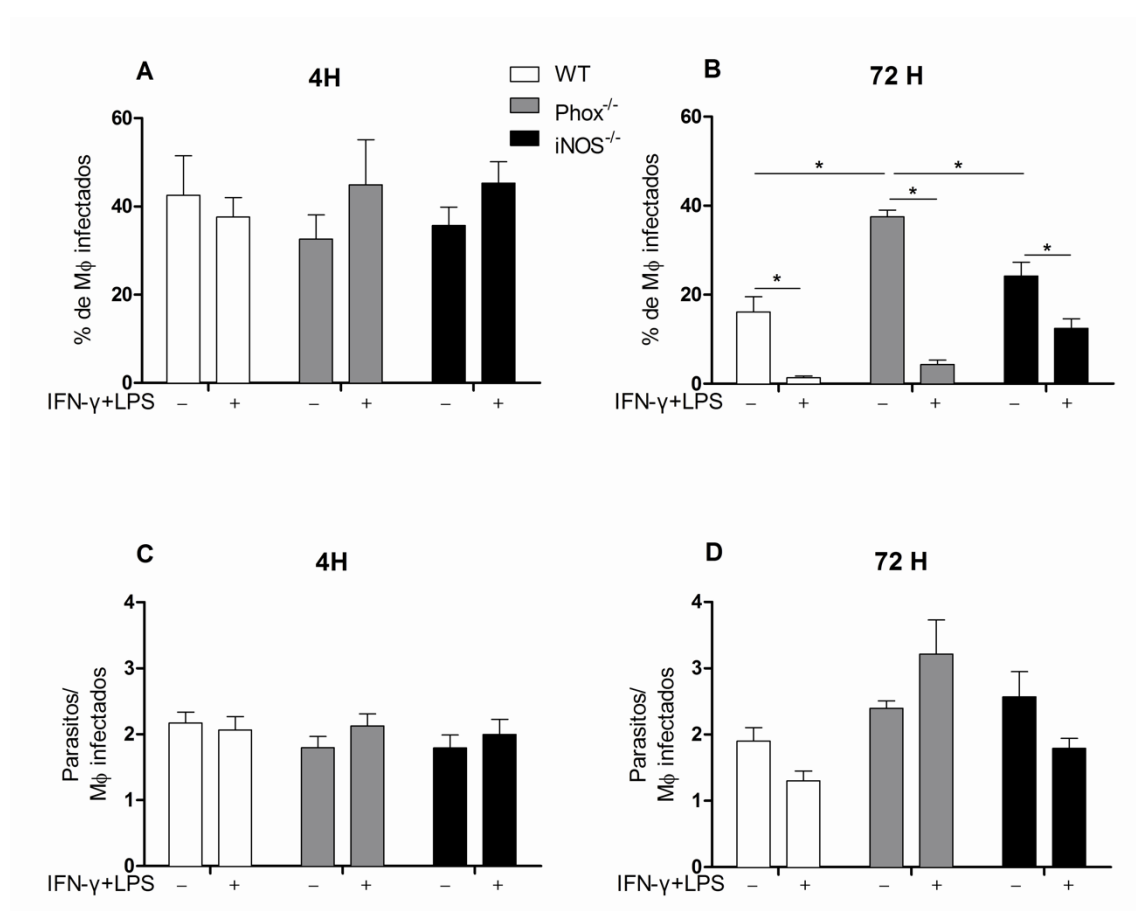


Figura 9: Avaliação da carga parasitária *in vitro*. Macrófagos de camundongos C57BL/6 WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} foram cultivados em uma concentração de 5×10^6 /mL. As células foram estimuladas ou não com IFN- γ (100U/mL) e LPS (100ng/mL) por 12 a 16 horas. Em seguida os macrófagos aderidos foram infectados com *L. infantum* em uma relação de dez parasitos por macrófago. Após quatro e 72 horas de infecção a porcentagem de macrófagos infectados [A e B] e o número de parasitos por macrófagos infectados [C e D] foram determinados. As lamínulas foram coradas com Diff-Quick (ver Materiais e Métodos). A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA two-way) e seguidos de teste de Tukey. * indica $P < 0,05$.

5.2 - Infecções de camundongos com *L. infantum*

5.2.1 - Diferenças na carga parasitária nas orelhas de camundongos infectados com *L. infantum* RFP

Após verificar a importância das ROS na infecção *in vitro*, decidimos realizar estudos *in vivo* através da inoculação intradérmica de *L. infantum* nas orelhas de camundongos WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* nos estágios iniciais da infecção. Estudos na literatura buscam entender o papel das ROS nas infecções por diferentes espécies de *Leishmania*, no entanto, a maioria utiliza infecções subcutâneas e no caso de espécies de *Leishmania* que causam a forma visceral da doença muitos utilizam a via endovenosa. O modelo que reflete melhor os eventos que ocorrem logo após a entrada do parasito no hospedeiro e assemelham à infecção natural é o da inoculação intradérmica. Decidimos então avaliar a carga parasitária nas orelhas dos camundongos infectados com *L. infantum* nos tempos iniciais de estabelecimento da infecção. Camundongos WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* foram infectados na orelha por via intradérmica com 10^6 formas metacíclicas de *L. infantum* e a carga parasitária foi mensurada entre 6 e 72 horas. Verificamos um maior número de parasitos nas orelhas de camundongos *Phox^{-/-}* 12 horas após infecção em relação aos camundongos WT e *iNOS^{-/-}*. Nos tempos seguintes houve diminuição na carga parasitária nos três grupos de animais, sendo que esta foi maior nas orelhas de animais WT e menor nos animais *Phox^{-/-}*. A carga parasitária nas orelhas de animais *iNOS^{-/-}* foi intermediária. (Figura 10).

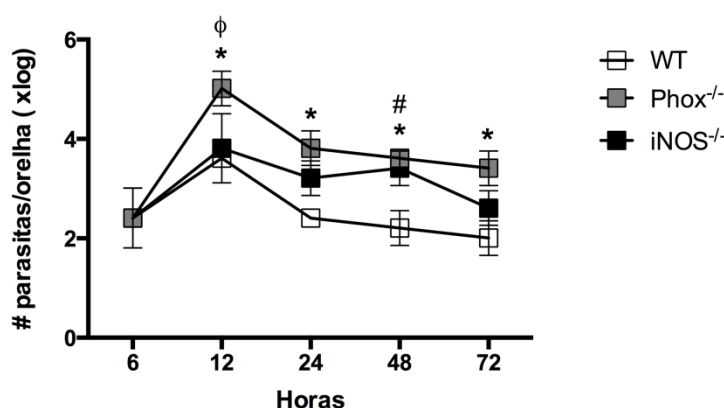


Figura 10: Carga parasitária nas orelhas de camundongos. Orelhas de camundongos C57BL/6 WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* foram infectadas na derme com 10^6 formas metacíclicas de *L. infantum* e a infecção foi seguida entre seis e 72 horas. A carga parasitária foi estimada por diluição seriada entre sete e dez dias de cultura. Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 2 (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e *Phox^{-/-}*, # indica diferenças

entre WT e iNOS^{-/-} e ϕ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde $P < 0,05$ (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

5.2.2 - Cinética de migração celular para o sítio de infecção

Diferentes espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de serem os principais mecanismos efetores no controle de patógenos intracelulares, podem desempenhar importantes funções na modulação da resposta imune. Durante infecção por *L. amazonensis*, recente estudo de nosso grupo verificou diferenças no perfil inflamatório entre animais WT e Phox^{-/-}. Para melhor avaliar o perfil celular inflamatório presente no sítio de infecção, decidimos caracterizar as células envolvidas nos tempos iniciais logo após inoculação do parasito por citometria de fluxo. Assim, camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} tiveram suas orelhas infectadas com 10^6 formas promastigotas de *L. infantum* e após seis, 24, 48 e 72 horas de infecção as orelhas foram processadas como descrito em materiais e métodos. Como estratégia para identificação das subpopulações de células da resposta imune inata, inicialmente, separamos as células por sua granulosidade e tamanho, subsequentemente foram selecionadas exclusivamente células simples pela seleção das áreas SSA (side scatter area) e FSW (forward scatter weight) e finalmente procedemos para a marcação de superfície celular. O marcador CD11b (receptor de complemento 3) foi usado para identificação de células fagocíticas. A seguir utilizamos a expressão dos marcadores Ly6G e Ly6C para identificação de neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}) e monócitos (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C^{int/hi}) (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012). A população negativa para ambos marcadores, Ly6G e Ly6C, foi dividida para identificação de células dendríticas e macrófagos. As células dendríticas foram identificadas através da expressão dos marcadores CD11c e MHC II (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺MHC II⁺). Já os macrófagos foram identificados pela avaliação da expressão do marcador F4/80 (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁻MHC II⁺F4/80⁺). Ghosn *et al* demonstraram a expressão de CD11c em populações de macrófagos de forma dependente do clone utilizado na marcação (GHOSN *et al.*, 2010). A estratégia para identificação e caracterização das diferentes populações descritas anteriormente está representada na Figura 11.

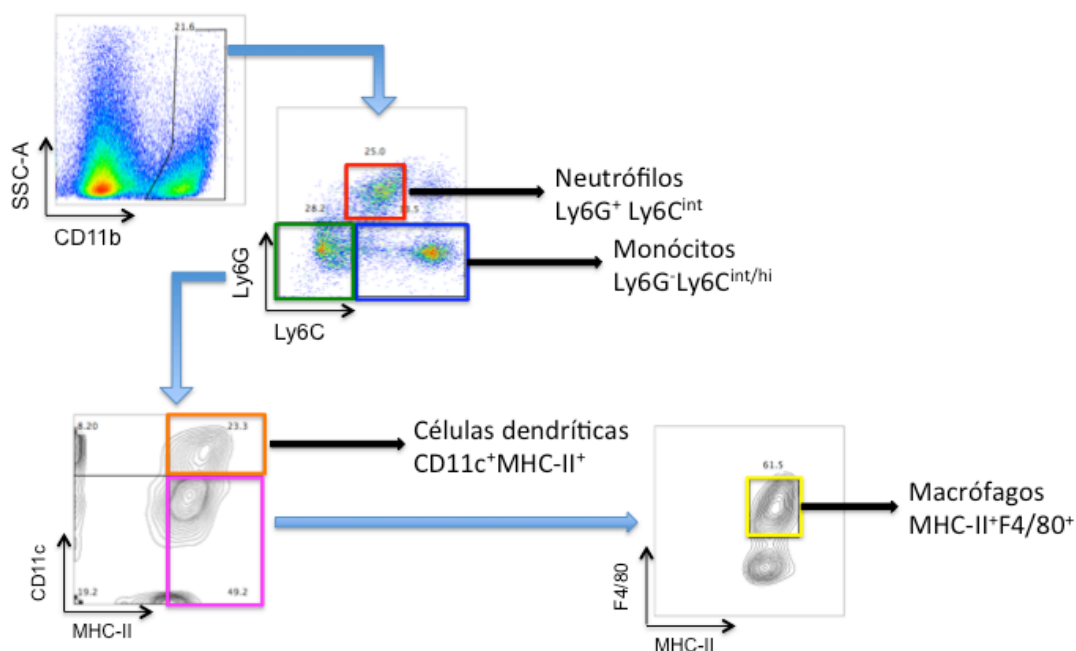


Figura 11: Estratégia de identificação das populações de células recrutadas para o local da infecção com *L. infantum* RFP. Orelhas de camundongos WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} foram infectadas com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e o recrutamento celular foi seguido no intervalo entre 6 horas e 72 horas após a infecção. As orelhas foram coletadas, processadas e em seguida as células tiveram seus marcadores de superfície corados com anticorpos específicos. Imagem representativa de uma amostra 12 horas após a infecção.

Inicialmente decidimos avaliar o recrutamento de células mielóides fagocíticas (CD11b⁺) após a inoculação do parasito. Verificou-se um aumento gradual e contínuo da porcentagem destas células em relação ao total de células recrutadas pelo tempo de infecção em todas as linhagens de camundongos. No entanto, 12 horas após a infecção houve um maior aumento da porcentagem destas células nos animais *Phox*^{-/-} em comparação com as outras duas linhagens. Quando comparado o número absoluto de células recrutadas também houve um aumento significativo destas células, após 12 horas de infecção, nos animais *Phox*^{-/-} e seguido de queda para valores similares aos de camundongos WT e *iNOS*^{-/-} nos tempos posteriores. Demonstramos, assim, que a presença do parasito promoveu um recrutamento celular mais intenso nos camundongos deficientes na produção de O_2^- 12 horas após a infecção (Figura 12).

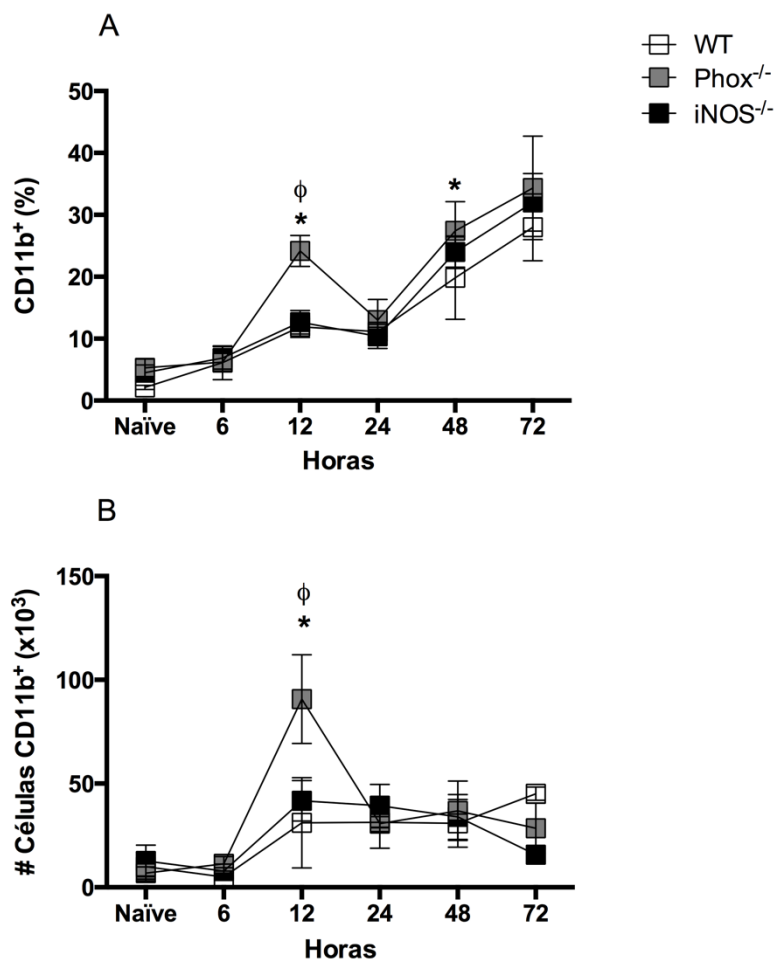


Figura 12: Porcentagem e número de células CD11b⁺ recrutadas para o local de inoculação de *L. infantum* RFP após 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. Orelhas de camundongos foram infectadas com 10⁶ promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e a infecção foi seguida pelos tempos indicados nas figuras. Dados representam a porcentagem (A) e o número de células (B) expressando o marcador CD11b. Os dados mostrados como média ± desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). Animais naïve não infectados foram usados como grupo controle. * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-}, # indica diferenças entre WT e iNOS^{-/-} e ϕ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde P < 0,05 (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

Após a verificação do aumento da população CD11b⁺ nos questionamos se haveria diferenças fenotípicas específicas na composição das subpopulações recrutadas nas três linhagens de camundongos. A Figura 13 mostra de forma representativa a cinética das células recuperadas do infiltrado inflamatório nas orelhas infectadas com *L. infantum* RFP nos diferentes tempos. Na caracterização deste infiltrado avaliamos a porcentagem (Figura 14) e o número absoluto (Figura 15) dos principais tipos celulares da imunidade inata relacionados com produção de ROS como neutrófilos, monócitos, células dendríticas e macrófagos. Considerando-se a porcentagem e o número de neutrófilos recrutados para o sítio de infecção verificamos que houve um aumento rápido porém transitório destas células nas três linhagens de camundongos. Seis horas após o início da infecção houve um aumento tanto na porcentagem quanto no número destas células nas três linhagens de camundongos, porém sem diferenças significativas e o pico ocorreu 12 horas após a infecção. É interessante notar que neste tempo a média da porcentagem de neutrófilos nas orelhas dos camundongos *Phox*^{-/-} foi muito maior que nas demais linhagens representando 52% das células CD11b⁺. No entanto, 22% e 35% foram as médias das porcentagens de neutrófilos neste tempo nos animais WT e *iNOS*^{-/-}, respectivamente. Em seguida houve uma marcante diminuição destas porcentagens entre os tempos de 48 e 72 horas, alcançando níveis basais no último tempo nos animais WT e *iNOS*^{-/-}. Mais uma vez interessante de se notar foi uma menor diminuição da porcentagem de neutrófilos nos animais *Phox*^{-/-} após 24 horas e a manutenção desta até o último tempo avaliado (Figura 14A). Considerando o número absoluto de neutrófilos ao longo do tempo percebe-se a mesma tendência em relação à porcentagem (Figura 15A).

Ao avaliarmos o percentual de monócitos no sítio da infecção verificamos que gradualmente houve um aumento nas três linhagens de camundongos através do tempo de infecção, sendo que nos tempos de 48 e 72 horas os camundongos WT e *iNOS*^{-/-} apresentaram um comportamento semelhante no recrutamento destas células e houve menor porcentagem nos camundongos *Phox*^{-/-} (Figura 14B). Analisando o número destas células no local da infecção ao longo do tempo encontramos dois padrões diferentes de recrutamento em relação às três linhagens. Houve aumento do

número de monócitos a partir do tempo de 12 horas de forma progressiva até 72 horas nos animais WT e iNOS^{-/-}. Já nos animais Phox^{-/-} o que verificou-se foi um maior aumento de monócitos no tempo de 12 horas seguido de drástica diminuição destes números até 72 horas pós infecção (Figura 15B).

Para as células dendríticas, não encontramos grandes variações da porcentagem destas células ao longo do tempo avaliado de infecção nas três linhagens de camundongos. Sendo que aparentemente os animais iNOS^{-/-} e os Phox^{-/-} apresentaram maior e menor percentual de células dendríticas em todos os tempos, respectivamente (Figura 14C). Em relação ao número de células dendríticas não houve diferenças entre os animais WT e Phox^{-/-}. Já os animais iNOS^{-/-} apresentaram números maiores e similares nos tempos de 12 e 24 horas seguido de leve queda até alcançar valores semelhantes aos dos outros animais 72 horas após a infecção (Figura 15C).

Em relação aos macrófagos presentes no infiltrado inflamatório não encontramos grandes variações tanto no percentual quanto no número de células quando comparadas três linhagens de camundongos (Figuras 14D e 15D).

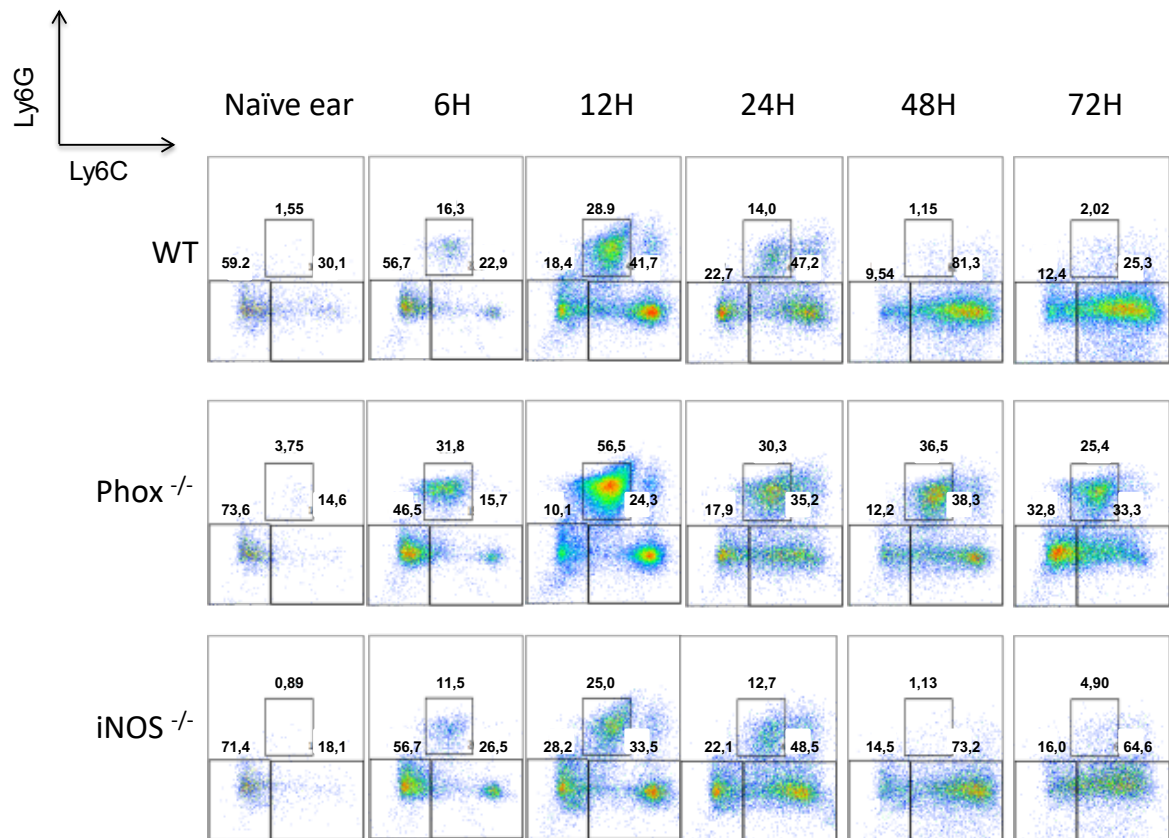


Figura 13: Cinética do recrutamento de células mieloides após inoculação intradérmica de *L. infantum* RFP. Dot plots representativos das células de orelhas de camundongos WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} recuperadas em diferentes tempos após a infecção intradérmica com 10⁶ *L. infantum* RFP ou orelhas não infectadas como controle (NI). As subpopulações de células mieloides CD11b⁺ foram definidas seguindo as seguintes marcações: neutrófilos (Ly6G⁺Ly6C^{int}); monócitos (Ly6G⁻Ly6C^{int/hi}); células dendríticas (Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺MHC II⁺) e macrófagos (Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺MHC II⁺F4/80⁺). Os dados mostrados são de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento).

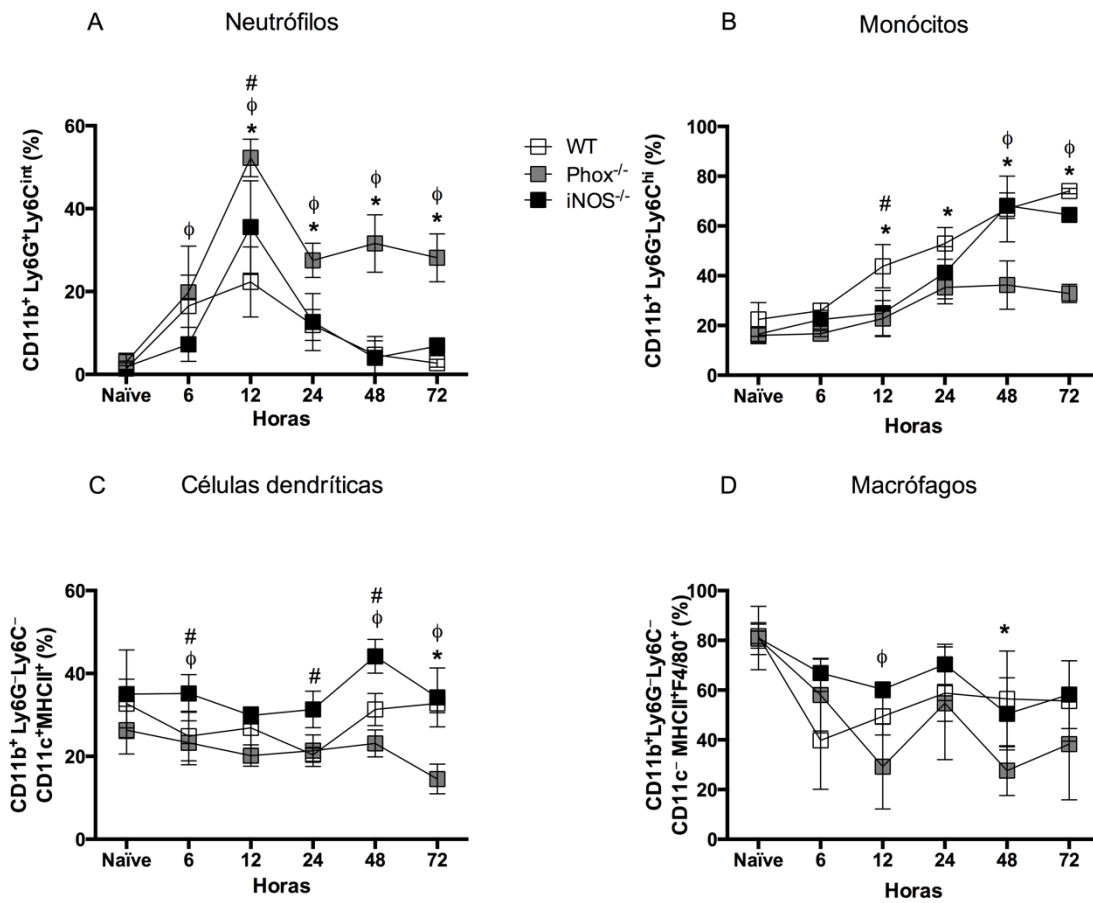


Figura 14: Porcentagem das subpopulações de células CD11b⁺ recrutadas para o local de inoculação de *L. infantum* RFP após 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. Orelhas de camundongos WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} foram infectadas com 10⁶ promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para realização imunofenotipagem por citometria de fluxo. Dados representam a porcentagem de neutrófilos (A), monócitos (B), células dendríticas (C) e macrófagos (D). Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e *Phox*^{-/-}, # indica diferenças entre WT e *iNOS*^{-/-} e φ indica diferenças entre *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} onde P < 0,05 (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

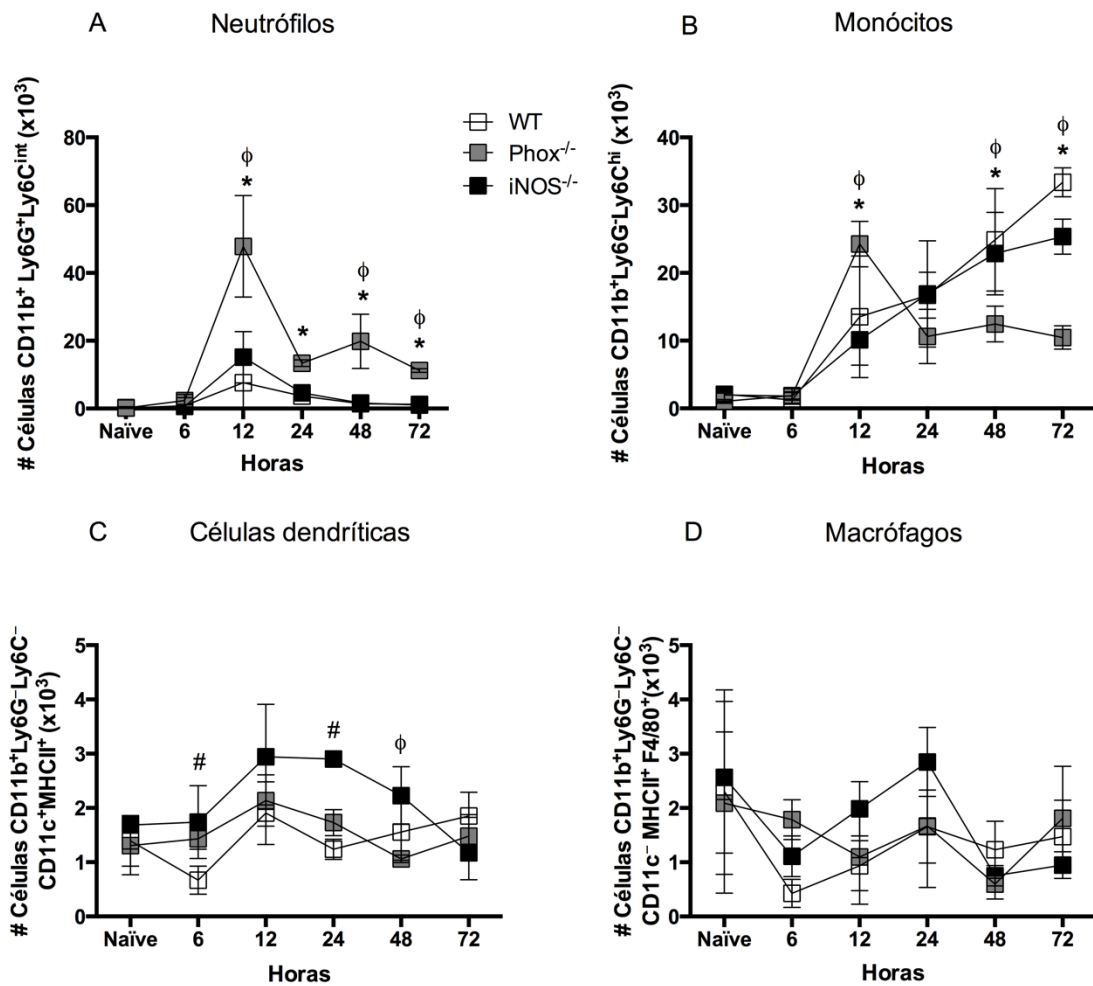


Figura 15: Número absoluto das subpopulações de células CD11b⁺ recrutadas para o local de inoculação de *L. infantum* RFP após 6h, 12h, 24h, 48h e 72h. Orelhas de camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram infectadas com 1x10⁶ promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para realização imunofenotipagem por citometria de fluxo. Dados representam os números absolutos de neutrófilos (A), monócitos (B), células dendríticas (C) e macrófagos (D). Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-}, # indica diferenças entre WT e iNOS^{-/-} e φ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde P < 0,05 (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

5.2.3 - Análise das subpopulações mielóides infectadas por *L. infantum* RFP

Utilizando a infecção com a *L. infantum* que expressa de forma estável a proteína RFP, avaliamos de que forma este parasito infecta as células hospedeiras ao longo da infecção, quais os tipos celulares infectados, e se a ausência de ROS poderia influenciar este processo. Inicialmente utilizamos a mesma estratégia de seleção das células mielóides expressando CD11b e aplicamos sobre ele o *gate* de expressão positiva do sinal RFP do parasito como demonstrado na parte superior da figura 12. Primeiramente comparamos a taxa de infecção de leucócitos CD11b⁺ entre os grupos. Não encontramos diferença no percentual de células infectadas nos três grupos de animais entre 6 e 72 horas após a infecção. Ocorreu um pico na porcentagem de células CD11b⁺ infectadas após 12 horas e seguido de diminuição e manutenção da porcentagem até 72 horas (Figura 17A). Entretanto, analisando o número de células infectadas, apenas no tempo de 12 horas da infecção encontramos significativa diferença nos leucócitos parasitados dos animais *Phox*^{-/-} em comparação com os WT e *iNOS*^{-/-} (Figura 17B). Estes dados estão coerentes com o que encontramos através da técnica de diluição limitante para ambos os grupos (Figura 10).

Em seguida procedemos à aplicação das mesmas regiões selecionadas para as populações expressando os marcadores de superfície Ly6G e Ly6C descritas no experimento anterior. Para melhor avaliação dos resultados delimitamos três populações distintas de células: os neutrófilos (Ly6G⁺Ly6C^{int}); células não inflamatórias (Ly6G⁻Ly6C⁻) e monócitos (Ly6G⁻Ly6C^{int/hi}). Os painéis inferiores da figura 12 mostram de forma representativa a cinética das subpopulações de células infectadas por *L. infantum* RFP recuperadas do infiltrado inflamatório nas orelhas de camundongos WT, *Phox*^{-/-} e *iNOS*^{-/-} nos diferentes tempos.

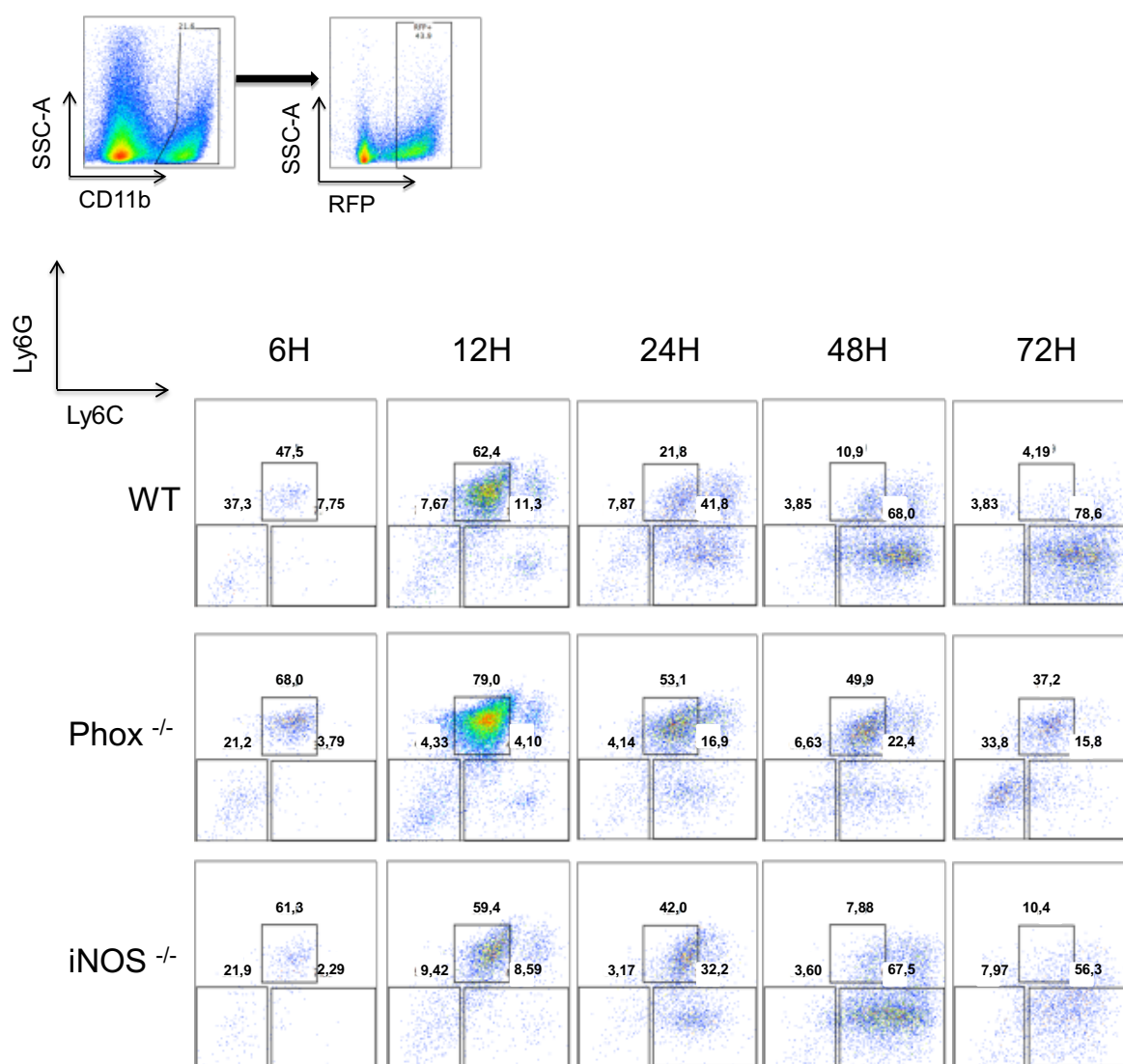


Figura 16: Cinética das subpopulações de células mieloides infectadas por *L. infantum* RFP. Dot plots representativos das células infectadas recuperadas em diferentes tempos após a infecção intradérmica com 1×10^6 *L. infantum* RFP. As subpopulações de células mieloides RFP⁺CD11b⁺ foram definidas seguindo as seguintes marcações: neutrófilos (Ly6G⁺Ly6C^{int}); monócitos (Ly6G⁻Ly6C^{int/hi}); células dendríticas (Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺MHC II⁺) e macrófagos (Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺MHC II⁺F4/80⁺). Os dados mostrados são de um experimento representativo de 3 (n=3 por grupo em cada experimento).

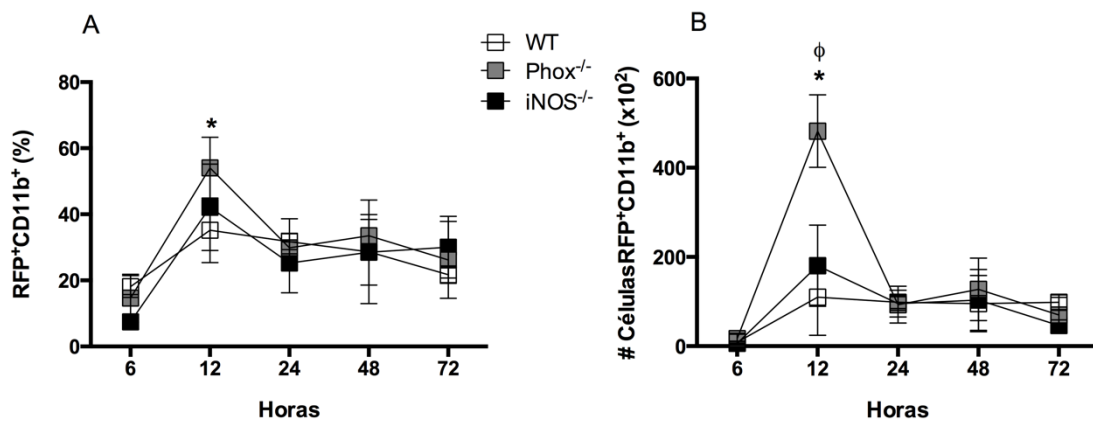


Figura 17: Cinética de infecção de células CD11b⁺. Camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} infectados com 10⁶ formas metacíclicas de *L. infantum* RFP na orelha foram sacrificados nos tempos indicados. A porcentagem de células CD11b⁺ com sinal RFP, oriundo do parasito foi quantificado por citometria de fluxo (A), assim como o número total de células CD11b⁺RFP⁺ (B). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-} e ϕ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde $P < 0,05$ (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

Pela análise da população total de células RFP⁺ selecionadas no *gate* de CD11b⁺ conseguimos avaliar a cinética das subpopulações de células infectadas ao longo do tempo. Esta análise foi feita considerando-se a porcentagem de células infectadas (Figura 18) e número de células infectadas (Figura 19). Após 6 e 12h de infecção a principal célula hospedeira é o neutrófilo para todas as linhagens de camundongos. A porcentagem de células CD11b⁺RFP⁺ que eram neutrófilos alcançou pico após 12 horas de infecção nas três linhagens de camundongos, entretanto, não houve diferenças entre estes grupos ao longo do tempo (Figura 18A). Mas, ao avaliarmos o número destas células, podemos verificar que nos animais WT houve o menor número de células infectadas, seguido pelos animais iNOS^{-/-}. Porém, no tempo de 12 horas após a infecção houve um aumento considerável destas células nos animais Phox^{-/-}. Estes dados seguem a tendência de maior porcentagem e número de neutrófilos mostrados na Figura 14A e Figura 15A, respectivamente. Quando considerada a subpopulação de monócitos infectados verificamos que a porcentagem destas células aumenta lenta e gradualmente em relação ao tempo de infecção e foi similar nos diferentes grupos (Figura 18B). Em relação ao número destas células não houve diferenças nos tempos iniciais e alcançou o pico 48 horas após a infecção nos animais WT e iNOS^{-/-} e diminui ligeiramente no tempo de 72 horas. Já nos animais

$Phox^{-/-}$ o número de monócitos infectados aumenta a partir de 12 horas e permanece constante até o último tempo avaliado, sendo sempre menor em relação aos animais WT e $iNOS^{-/-}$ (Figura 19B). Por fim, encontramos as células não inflamatórias, que compreendem células dendríticas e macrófagos, apresentando porcentagens bastante variáveis quando comparados os grupos de camundongos. Por todo o tempo avaliado houve menor porcentagem destas células infectadas nos animais $iNOS^{-/-}$ seguidos pelos animais WT. Nos animais $Phox^{-/-}$ as células não inflamatórias infectadas apresentaram maior percentual nos tempos de 12 e 72 horas (Figura 18C). O número de células não inflamatórias seguiu a mesma tendência da porcentagem (Figura 19C). Destacamos o fato de que 12 horas após a infecção as principais células hospedeiras são os neutrófilos nos animais $Phox^{-/-}$, com discreta participação de monócitos e células não inflamatórias neste tempo de infecção.

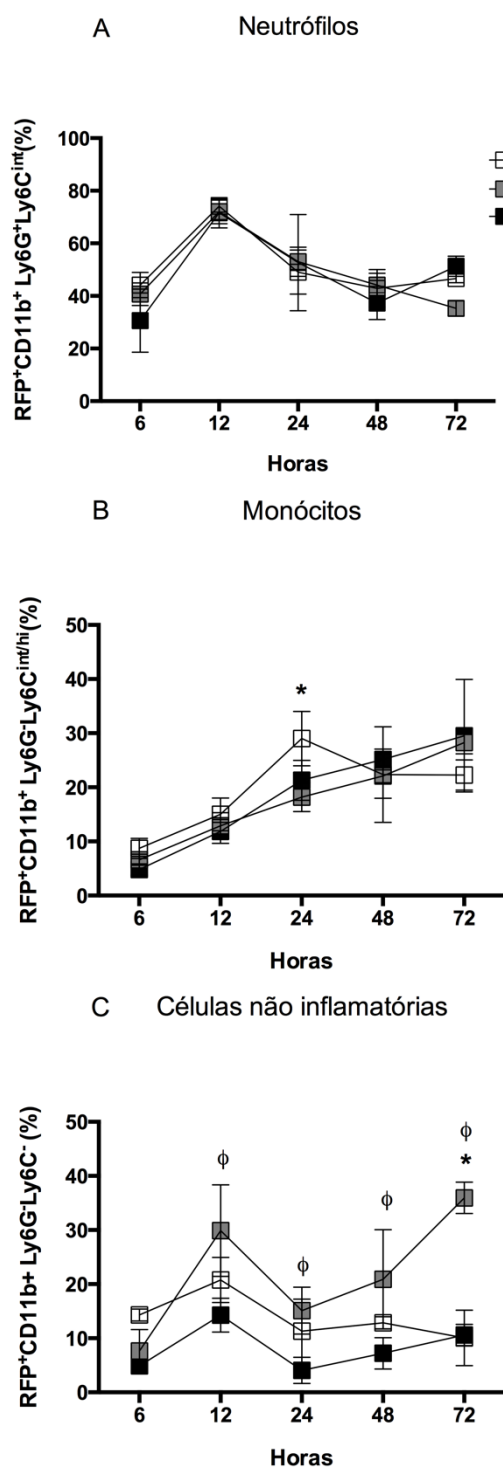


Figura 18: Porcentagem das subpopulações de células RFP⁺CD11b⁺. Orelhas de camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram infectadas com 10⁶ promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para realização imunofenotipagem por citometria de fluxo. Dados representam a porcentagem de células RFP⁺CD11b⁺ que são neutrófilos (A), monócitos (B), células não inflamatórias (C). Os dados mostrados como média ± desvio padrão de um experimento representativo de 3 (n=3 por

grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e $\text{Phox}^{-/-}$ e ϕ indica diferenças entre $\text{Phox}^{-/-}$ e $\text{iNOS}^{-/-}$ onde $P < 0,05$ (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

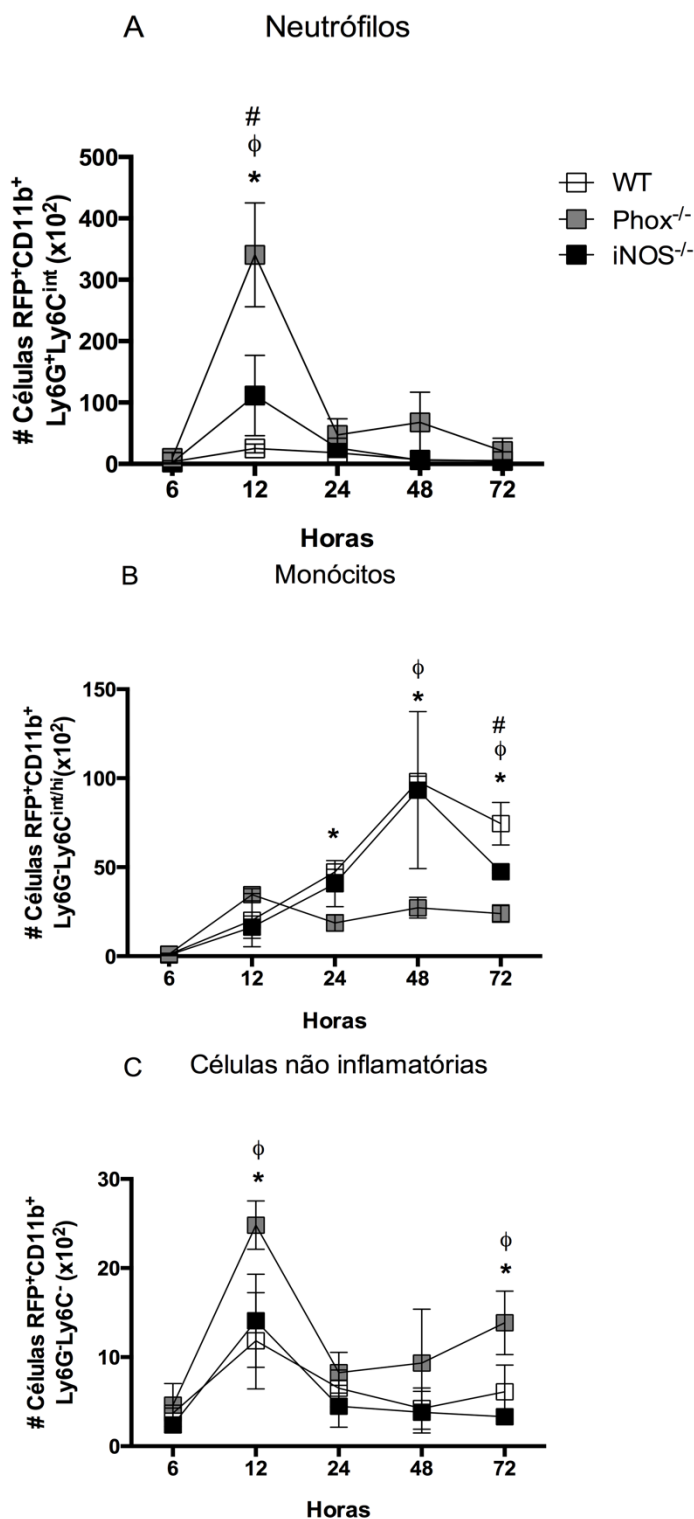


Figura 19: Número de células $\text{RFP}^+\text{CD11b}^+$. Orelhas de camundongos WT, $\text{Phox}^{-/-}$ e $\text{iNOS}^{-/-}$ foram infectadas com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para realização imunofenotipagem por citometria de fluxo. Dados representam o número de células $\text{RFP}^+\text{CD11b}^+$ que

são neutrófilos (A), monócitos (B), células não inflamatórias (C). Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo de 3 ($n=3$ por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e $\text{Phox}^{-/-}$, # indica diferenças entre WT e $\text{iNOS}^{-/-}$ e ϕ indica diferenças entre $\text{Phox}^{-/-}$ e $\text{iNOS}^{-/-}$ onde $P < 0,05$ (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

5.2.4 - Produção de quimiocinas no sítio da infecção por *L. infantum*

Após análise da composição do infiltrado inflamatório nos estágios iniciais da infecção induzida por *L. infantum* verificamos uma presença marcante de neutrófilos nas orelhas dos animais $\text{Phox}^{-/-}$ 12 horas após a inoculação do parasito e a persistência destas células nos outros tempos subsequentes. Além de terem sido os neutrófilos as principais células hospedeiras do parasito. Sendo assim, nos perguntamos qual seria a influência das ROS para a migração dos neutrófilos ao sítio de infecção. A migração celular para regiões com dano tecidual é induzida por uma série de mediadores químicos como quimiocinas. CXCL1 e CXCL2 são as mais importantes quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e atua de forma redundante, já que CXCL2 pode se ligar ao mesmo receptor na superfície de neutrófilos (CXCR-1/2) que a CXCL1 (DE *et al.*, 2008; DUNSTAN *et al.*, 1996; KOBAYASHI, 2008). Já CCL2 é uma quimiocina conhecida por atrair monócitos, celular dendríticas, células NK e linfócitos T de memória e que se liga ao receptor CCR2 (DALY; ROLLINS, 2003; MURDOCH; FINN, 2000; MURPHY *et al.*, 2000). Observamos uma maior migração de neutrófilos em orelhas de camundongos $\text{Phox}^{-/-}$ em relação aos WT e $\text{iNOS}^{-/-}$. Visando o melhor entendimento da intensa migração destas células seguimos o mesmo protocolo de infecção utilizado para determinação do recrutamento celular e a quantificação dos níveis das quimiocinas de interesse no tecido infectado foi realizada por ELISA. A produção de CXCL1, CXCL2 e CCL2 nas orelhas infectadas no período entre seis horas e 72 horas após infecção é mostrado na figura 20A, B e C. A produção de CXCL1 e CXCL2 foi maior no tempo de 12 horas nas três linhagens de camundongos. No entanto, houve uma maior produção de CXCL1, nos tempos de seis horas e 12 horas, e CXCL2, nos tempos de 12 horas e 24 horas, nos camundongos $\text{Phox}^{-/-}$ comparando com animais WT e $\text{iNOS}^{-/-}$. Após esse período ocorre uma queda gradual tanto na produção de CXCL1 quanto CXCL2 até 72 horas após a infecção nos três grupos de animais estudados. A produção máxima destas quimiocinas, coincidentemente, acontece concomitantemente com os maiores níveis de migração de neutrófilos no tecido

infectado, enquanto sua queda pode indicar a subsequente diminuição na porcentagem e número de neutrófilos vista 48 horas após a infecção (Figura 20A e B). Em contraste às outras quimiocinas, baixos níveis de CCL2 foram produzidos e sem diferenças nos três grupos de animais ao longo de todo o curso inicial da infecção (Figura 20C).

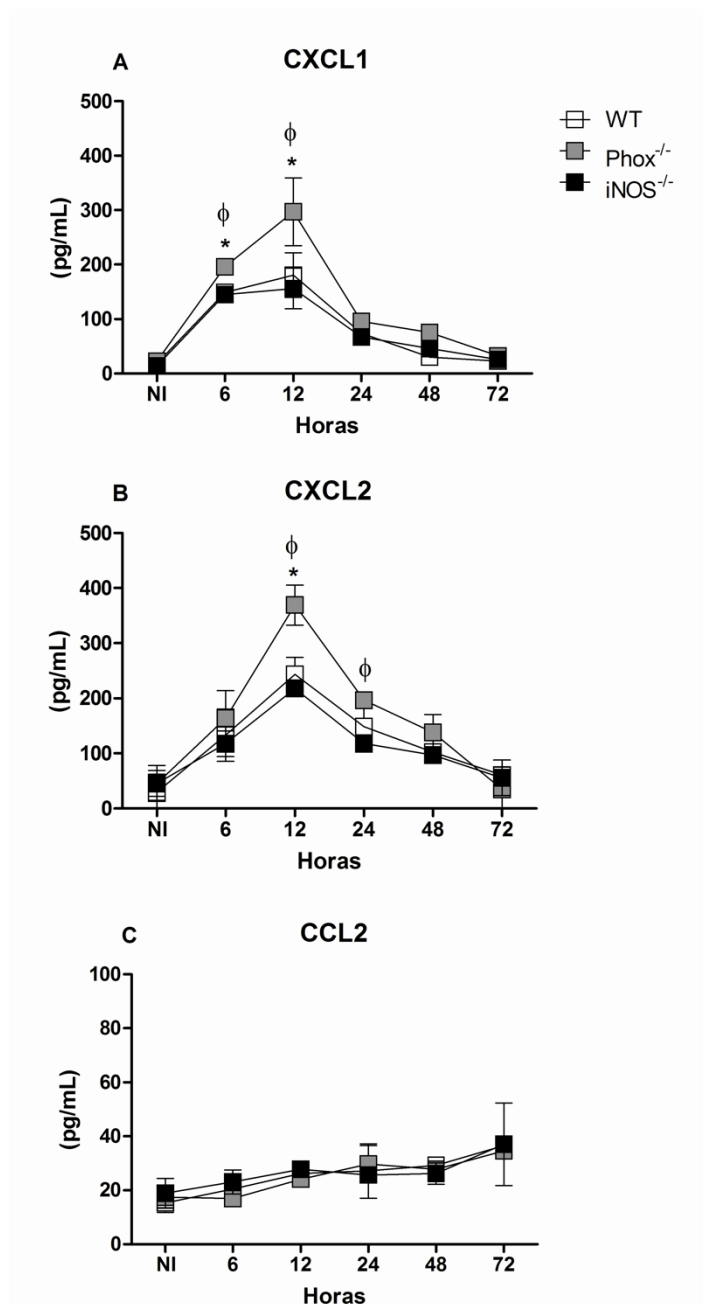


Figura 20: Diferenças na produção de CXCL1 e CXCL2 no local da infecção com *L. infantum*. Camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram infectados na orelha intradermicamente com 10⁶ formas metacíclicas de *L. infantum* e nos tempos indicados foram eutanasiados e suas orelhas coletadas para a dosagem dos níveis de CXCL-1 (A), CXCL-2(B) e CCL2 (C) por ELISA. Os dados são apresentados

como média $\pm$ EP para cada grupo (3 por grupo). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-} e ϕ indica diferenças entre Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} onde $P < 0,001$. (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

5.2.5 – Ausência de ROS induz morte de neutrófilos por necrose no local da infecção por *L. infantum*.

Ao relacionarmos os dados de porcentagem e número de neutrófilos com a maior produção de CXCL1 e CXCL2 induzidos pela presença da *L. infantum*, verificamos que houve maior produção destas quimiocinas simultaneamente à presença destas células nas orelhas de animais Phox^{-/-}. Entretanto, nos demais tempos de infecção, tanto a porcentagem quanto o número de neutrófilos, apesar de diminuir, permanecem maiores e constantes quando comparados aos outros animais. Interessantemente, os níveis das quimiocinas produzidas nas orelhas nestes animais, 24 horas após infecção, sofrem uma queda e são comparáveis aos níveis encontrados nos outros grupos. Assim nos questionamos o motivo da permanência destes neutrófilos no sítio de infecção após a queda da produção dos agentes responsáveis pelo recrutamento celular.

Apesar do importante papel das ROS em diferentes tipos de infecções, atuando como moléculas oxidantes e causando danos aos micro-organismos, estes radicais também estão envolvidos na sinalização intracelular e outros processos como apoptose em condições de estresse. Neutrófilos podem sofrer danos durante a explosão respiratória produzida por eles mesmos como resposta a infecções, e por causa deste processo, eles podem iniciar processos de apoptose. Devido à ausência de ROS para contribuir para a apoptose nos neutrófilos Phox^{-/-}, especulamos que estas células poderiam apresentar problemas no processo de apoptose dependente de ROS e eventualmente morrer através de mecanismos inflamatórios como a necrose. Para melhor entender se a acumulação de neutrófilos vista nos camundongos deficientes na produção de ROS poderia estar relacionada com possíveis diferenças nos mecanismos de morte celular nas fases iniciais da infecção nestes neutrófilos, decidimos avaliar as taxas de apoptose e necrose nestas células. Seguindo o mesmo protocolo de infecção intradérmica com as formas metacíclicas de *L. infantum* RFP, animais WT e Phox^{-/-} foram sacrificados nos tempos de 12, 24 e 48

horas após a infecção e a porcentagem e número de neutrófilos apoptóticos e necróticos foram avaliados.

Utilizamos 7-amino-actinomicina-D (7-AAD), um corante nuclear, e anexina V para identificar neutrófilos apoptóticos e necróticos. 7-AAD apresenta grande afinidade por moléculas de DNA, mas não tem a capacidade de atravessar as membranas celulares íntegras e funcionais (LECOEUR *et al.*, 1997). Assim, 7-AAD irá marcar o DNA quando as células estiverem morrendo e a membrana celular estiver danificada. Já a Anexina V liga-se às moléculas de fosfatidilserina presentes nas membranas celulares nos estágios iniciais da apoptose. Geralmente, os fosfolípidios da membrana contendo moléculas de fosfatidilserina encontram-se na face citoplasmática da membrana. Um dos sinais indicativos da apoptose é a presença destes fosfolípidios na face externa da membrana celular (LECOEUR *et al.*, 1997). Entretanto, neste ponto do processo de apoptose, a membrana celular continua seletiva e impede a incorporação do 7-AAD pelas células. Portanto, através da citometria de fluxo, podemos caracterizar as células apoptóticas sendo anexina V⁺ 7-AAD⁻ e as células necróticas sendo 7-AAD⁺ mesmo se estas forem positivas para anexina V, já que as células necróticas perdem a integridade da membrana.

Mais uma vez consideramos os neutrófilos a partir da seleção inicial da população CD11b⁺ seguida pela expressão de Ly6G⁺. Inicialmente comparamos a indução de apoptose e necrose através da porcentagem de neutrófilos infectados e não infectados com *L. infantum* (Figura 21A e B). Observamos que a infecção dos neutrófilos foi responsável pelo aumento na porcentagem de apoptose e necrose em todos os tempos avaliados. A figura 22 é representativa dos dot plots da porcentagem de neutrófilos necróticos e apoptóticos recuperados nos tempos de entre 12 e 48 horas após a infecção. A porcentagem de neutrófilos apoptóticos aumenta em relação às orelhas não infectadas (NI), mas permanece sem maiores variações entre 12 e 48 horas após a infecção tanto nos animais WT quanto nos animais Phox^{-/-} (Figura 23A). Ao avaliar os números de neutrófilos apoptóticos verificamos que ocorreu um aumento de aproximadamente 6 vezes após 12 horas de infecção comparando com as orelhas não infectadas em ambas as linhagens de camundongos. Nos demais tempos avaliados houve um declínio gradual no número de neutrófilos apoptóticos nas orelhas

dos animais WT e $\text{Phox}^{-/-}$ (Figura 23C). Ao avaliarmos a porcentagem de necrose em neutrófilos também não encontramos diferenças ao longo do tempo (Figura 23B), mas houve um aumento significativo no número de neutrófilos necróticos 12 horas após a infecção em ambas as linhagens de camundongos. Mas interessante houve queda nestes números nos tempos de 24 e 48 horas apenas nos neutrófilos WT. 24 horas após a infecção verificamos a maior diferença no número destas células quando comparados $\text{Phox}^{-/-}$ e WT. Apesar da queda nos números de neutrófilos necróticos $\text{Phox}^{-/-}$ no tempo de 48 horas ainda assim verificamos que eles eram maiores que os WT (Figura 23D). Como infectamos as orelhas dos camundongos com *L. infantum* expressando a proteína RFP, foi possível identificar o sinal do parasito e determinar o papel da *Leishmania* no processo de morte celular nos neutrófilos. Assim, avaliando a porcentagem (Figura 24A) e número de neutrófilos apoptóticos (Figura 24C) infectados com *L. infantum* não encontramos diferenças entre os animais WT e $\text{Phox}^{-/-}$ entre 12 e 48 horas. Entretanto, quando analisados os neutrófilos infectados necróticos, verificamos que no tempo de 24 horas a porcentagem média de neutrófilos $\text{Phox}^{-/-}$ foi de 64% e de WT 24% e 48 horas a porcentagem destas células foi aproximadamente 54% nos mutantes e 33% nos WT (Figura 23B). Observamos a mesma diferença entre as duas linhagens nos tempos de 24 e 48 horas quando considerados os números de neutrófilos necróticos (Figura 23D).

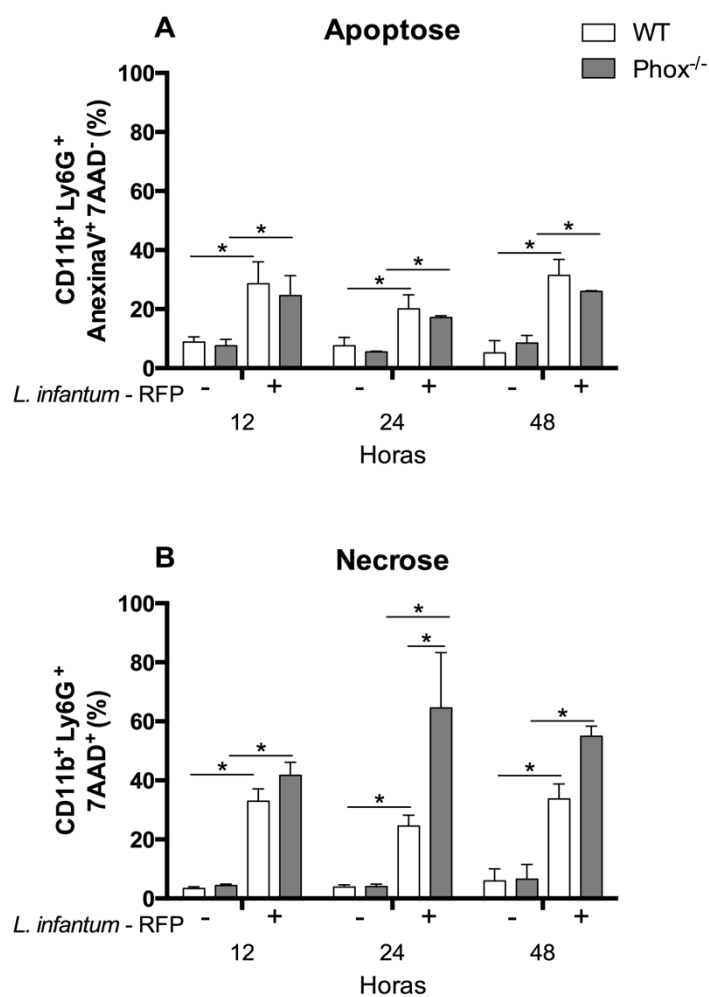


Figura 21: Indução de apoptose e necrose na população de neutrófilos infectados por *L. infantum* RFP. Avaliação das porcentagens de apoptose (A) e necrose (B) em neutrófilos/*L. infantum*-RFP⁻ e neutrófilos/*L. infantum*-RFP⁺ recuperados em diferentes tempos após a infecção intradérmica com 10⁶ *L. infantum* RFP. A população de neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺ caracterizada por Anexina V⁺ 7-AAD⁻ (apoptose) e 7-AAD⁺ (necrose). Os dados mostrados são de um experimento representativo (n=3 por grupo em cada experimento). * indica diferenças entre WT e Phox^{-/-} onde P < 0,05 (teste Two-Way ANOVA seguido de Bonferroni).

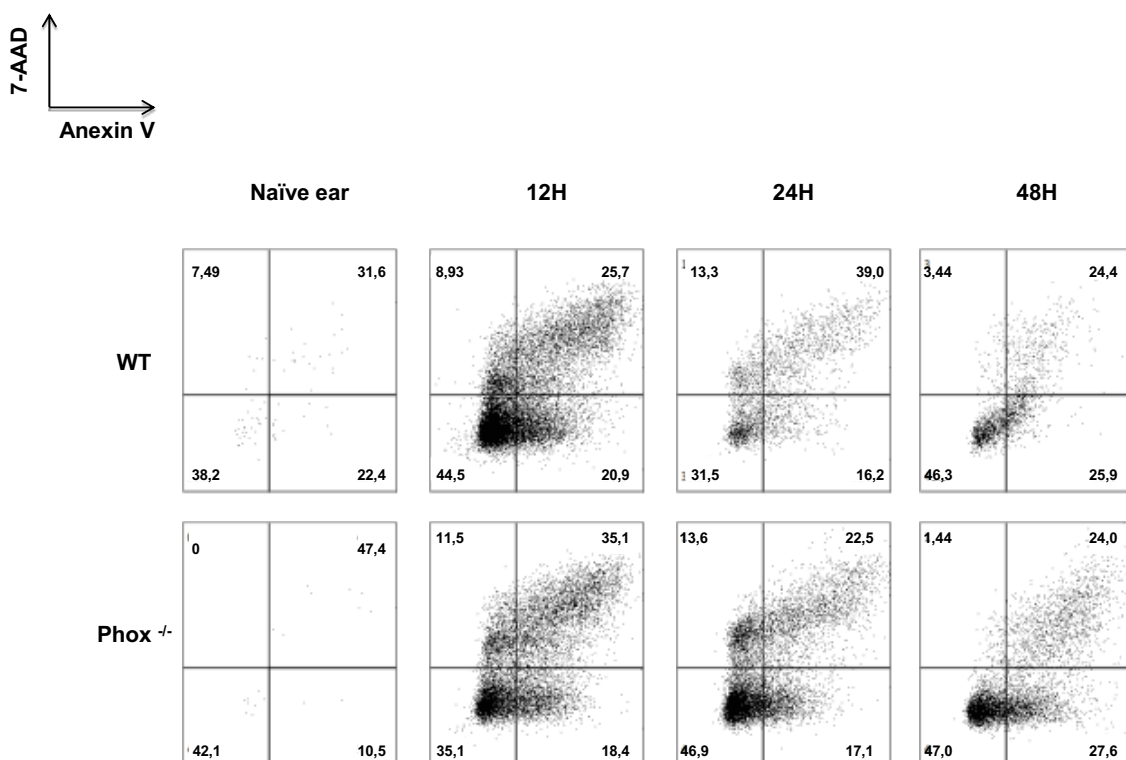


Figura 22: Cinética de apoptose e necrose na população de neutrófilos infectados por *L. infantum* RFP. Dot plots representativos das células infectadas recuperadas em diferentes tempos após a infecção intradérmica com 1×10^6 *L. infantum* RFP. A população de neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺ caracterizada por Anexina V⁺ 7-AAD⁻ (apoptose) e 7-AAD⁺ (necrose). Os dados mostrados são de um experimento representativo (n=3 por grupo em cada experimento).

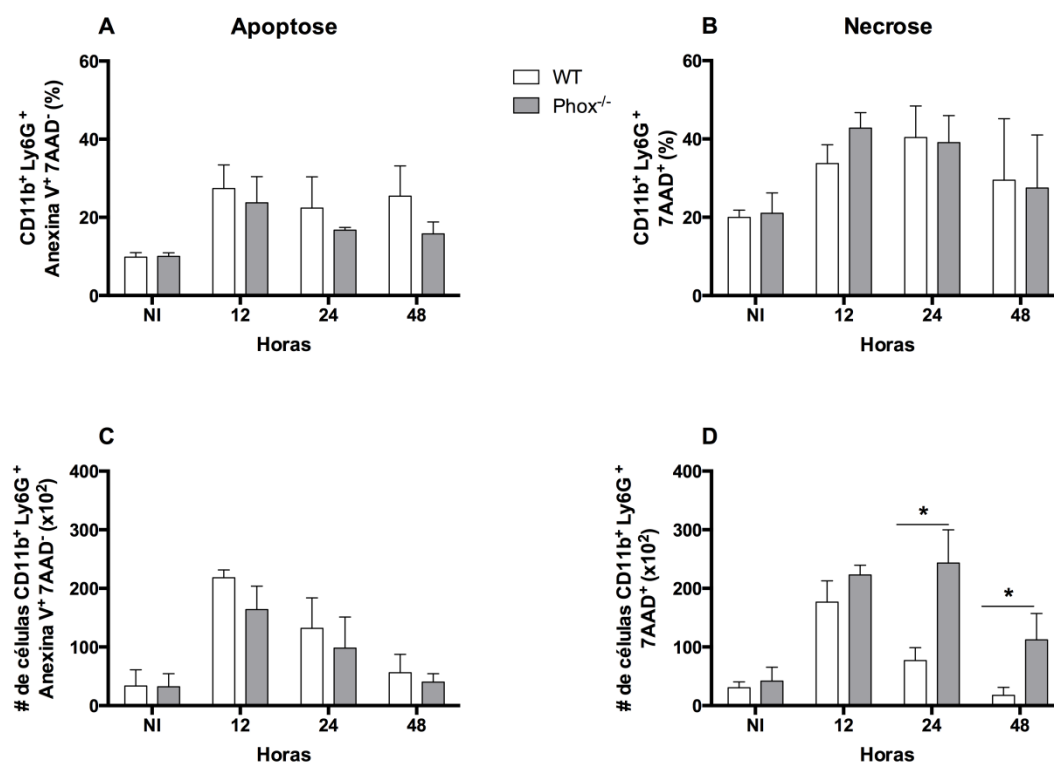


Figura 23: Porcentagem e número total de neutrófilos em apoptose e necrose no local da infecção por *L. infantum* RFP. Orelhas de camundongos WT, Phox^{-/-} e iNOS^{-/-} foram infectadas com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para análise por citometria de fluxo. Dados representam a porcentagem de apoptose (A) e necrose (B) em neutrófilos e número de neutrófilos morrendo por apoptose (C) e necrose (D). Orelhas não infectadas (NI). Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo (n=3 por grupo em cada experimento). A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA two-way). * indica $P < 0,05$.

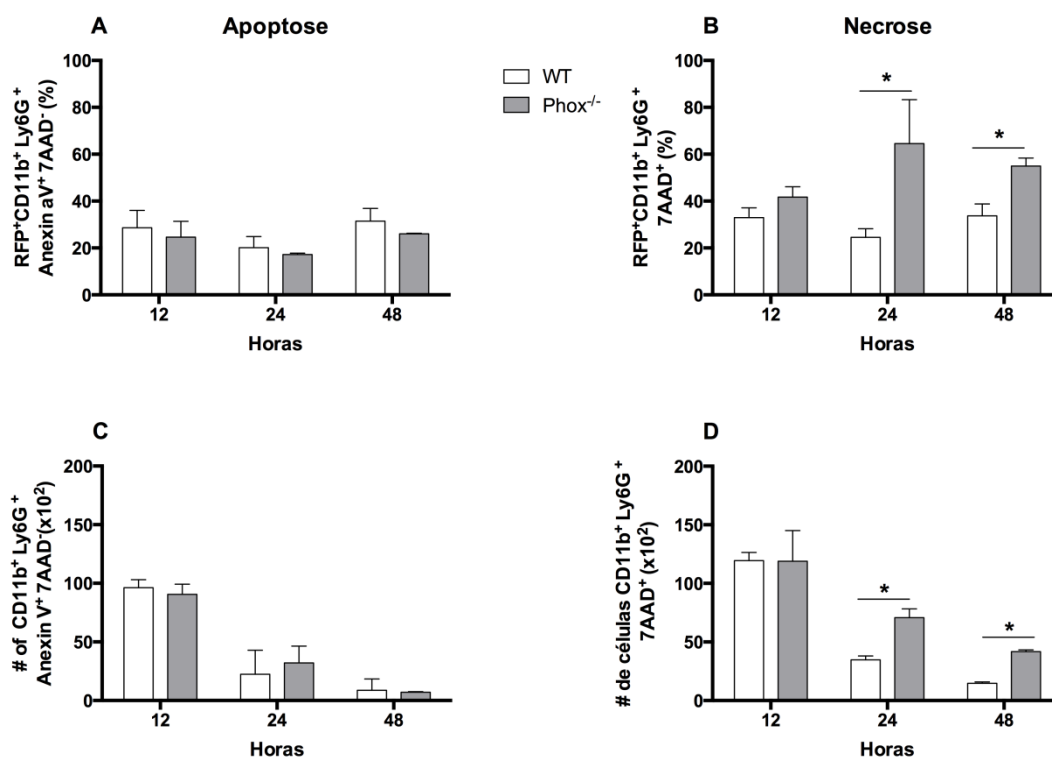


Figura 24: Porcentagem e número total de neutrófilos infectados em apoptose e necrose no local da infecção por *L. infantum* RFP. Orelhas de camundongos WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}* foram infectadas com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. infantum* RFP por via intradérmica e nos tempos indicados nos gráficos foram eutanasiados e suas orelhas coletadas e processadas para análise por citometria de fluxo. Dados representam a porcentagem de apoptose (A) e necrose (B) em neutrófilos infectados e número de neutrófilos infectados morrendo por apoptose (C) e necrose (D). Os dados mostrados como média $\pm$ desvio padrão de um experimento representativo (n=3 por grupo em cada experimento). A análise estatística foi feita por análise de variância (ANOVA two-way). * indica $P < 0,05$.

5.2.6 - Análise histológica de orelhas infectadas por *L. infantum*

Através da citometria de fluxo verificamos que 24 horas após a infecção houve maior número total de neutrófilos necróticos (Figura 23D) e maior percentual e número de neutrófilos infectados morrendo por necrose nas orelhas de animais $\text{Phox}^{-/-}$ (Figura 24B e D, respectivamente). A fim de confirmar a ideia de que a ausência de ROS induz a morte de neutrófilos $\text{Phox}^{-/-}$ infectados com *L. infantum* por necrose e não por apoptose, analisamos histologicamente o perfil do infiltrado inflamatório 24 horas após a infecção nas orelhas de camundongos WT e $\text{Phox}^{-/-}$. As imagens da figura 25 mostram a histologia da pele de orelha de camundongos WT e $\text{Phox}^{-/-}$ infectados por 24h com *Leishmania*. Foram observadas em ambas as linhagens uma inflamação intensa e difusa com infiltrado inflamatório misto apresentando neutrófilos, linfócitos e alguns macrófagos. Na orelha do animal $\text{Phox}^{-/-}$ foi observada também extensa área de necrose, mas sem ulcerações, o que soma ao evidenciado na imagem macroscópica em que foi observada uma área hiperêmica no local do inóculo (Figura 25C e D). Em conjunto com a diferença de área necrótica entre as duas linhagens, verificamos através de imuno-histoquímica que houve maior número de amastigotas nas orelhas de camundongos $\text{Phox}^{-/-}$ (Figura 26C e D) e quantificados como mostrado na figura 26E.

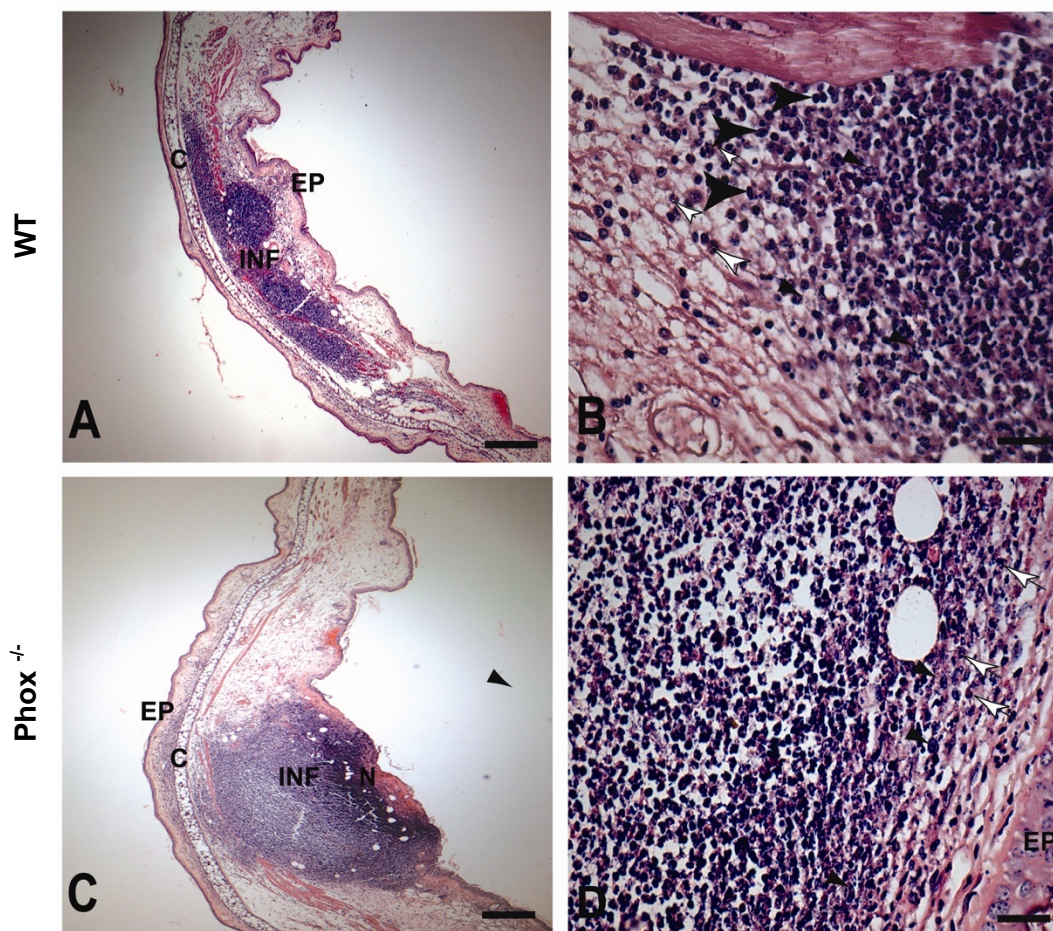


Figura 25: Cortes histológicos da pele de orelha de camundongos C57BL/6 WT e *Phox*^{-/-} infectados por *L. infantum*. A) Orelha de camundongos WT com inflamação intensa. B) Detalhe da figura em maior aumento evidenciando infiltrado inflamatório misto com neutrófilos (cabeça de setas branca), linfócitos (cabeça de setas preta grande) e alguns macrófagos com algumas *Leishmanias* (cabeça de setas pretas pequenas). Em C) observar orelha de camundongo *Phox*^{-/-} com inflamação intensa, difusa e área de necrose (N). D) detalhe de infiltrado inflamatório misto evidenciando neutrófilos (cabeça de setas preta e grande) e macrófagos com amastigotas de *Leishmania* (cabeça de setas preta pequena). EP – epiderme; C – cartilagem, N – necrose. INF - inflamação. A - D coloração pela H&E. Barra em A e C representa 62 μ m (50x) e em B e D - 16 μ m (400 x).

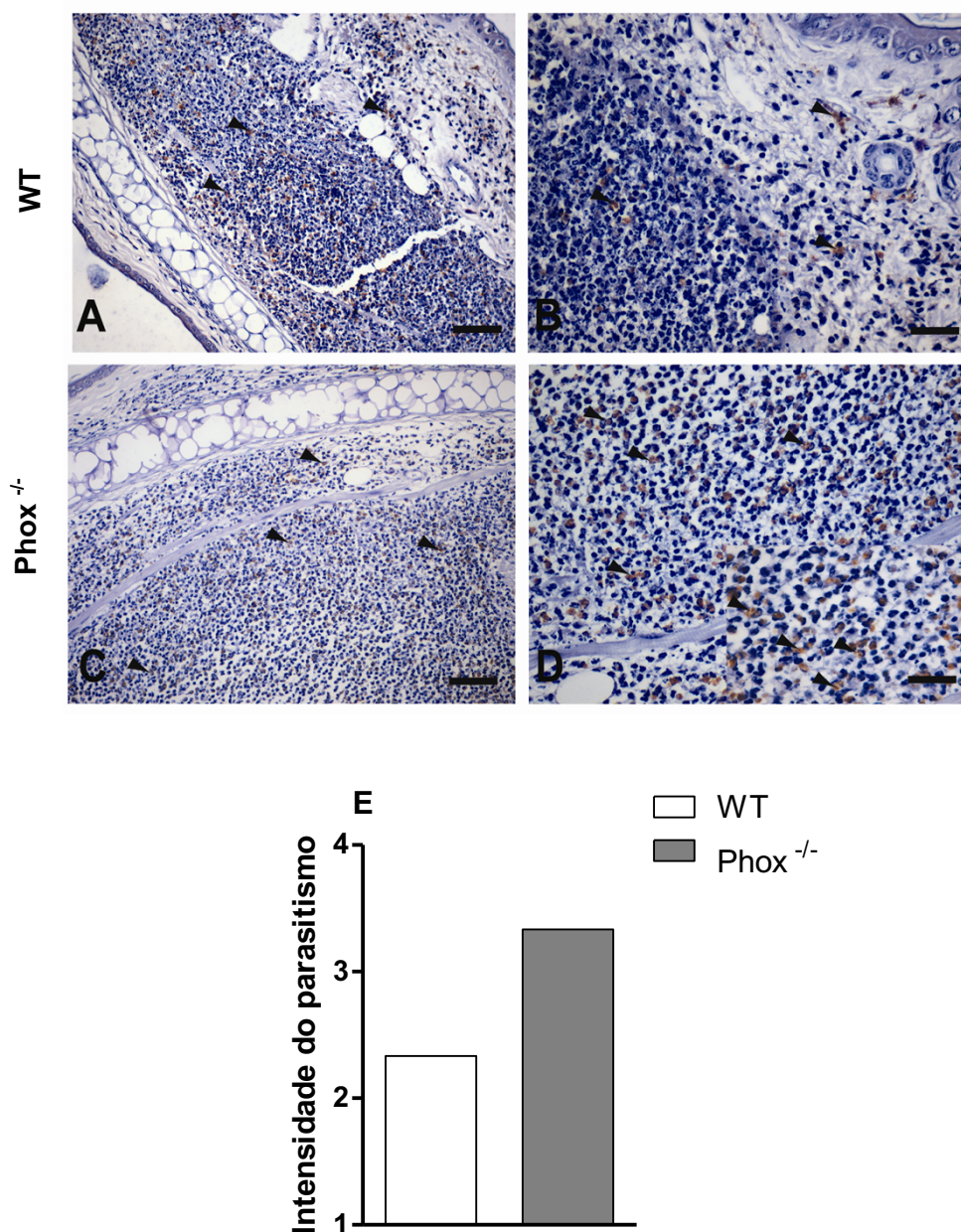


Figura 26: Imuno-histoquímica da pele de orelha de camundongos C57BL/6 WT (A e B) e *Phox*^{-/-} (C e D) infectados por *L. infantum* e quantificação de parasitos (E). Evidenciar amastigotas imunomarcadas (marrom) (cabeça de setas pretas). E) análise semi-quantitativa da intensidade parasitarias nas diferentes linhagens. 1 – ausente, 2 – discreto, 3 – moderado e 4 – intenso. Barra em A e C representa 32 μ m (200x) e B e D - 16 μ m (400 x).

6 - DISCUSSÃO

No presente trabalho buscamos evidenciar o papel das espécies reativas de oxigênio na infecção *in vitro* de macrófagos e nos estágios iniciais da infecção intradérmica na orelha de camundongos com *Leishmania infantum*.

O resultado da infecção por *Leishmania* é dependente dos eventos que ocorrem durante a resposta imune inata. Os principais eventos na interação entre a *Leishmania* e macrófagos são o reconhecimento dos parasitos, seguido por sua internalização (RABINOVITCH, 1967; RUSSELL; TALAMAS-ROHANA, 1989; STUART; EZEKOWITZ, 2005). O reconhecimento do parasito pode levar os macrófagos a produzirem ROS e RNS. $O_2^{\bullet-}$ e $NO^{\bullet}$ são moléculas bem conhecidas pelo envolvimento no mecanismo inato de defesa de macrófagos contra protozoários parasitas (CHANNON; ROBERTS; BLACKWELL, 1984; MURRAY; NATHAN, 1999; MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983). $O_2^{\bullet-}$ pode ser produzido por macrófagos, mesmo sem ativação prévia, durante o contato inicial dos parasitos com as células hospedeiras (MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983). Sua produção é dependente do recrutamento e acoplamento das subunidades citossólicas da NADPH oxidase para a membrana, resultando em sua ativação. Por outro lado, $NO^{\bullet}$ é uma molécula produzida somente em macrófagos ativados. Dependendo da espécie de *Leishmania* tanto $O_2^{\bullet-}$ quanto o $NO^{\bullet}$ podem ter papel crucial no controle da infecção (ASSREUY *et al.*, 1994; GIUDICE *et al.*, 2007; MUKBEL *et al.*, 2007). Além de sua própria toxicidade, $O_2^{\bullet-}$ é precursor de outras ROS, como H_2O_2 , $OH^{\bullet}$, $HOCl^{\bullet}$ (CHANNON; ROBERTS; BLACKWELL, 1984; MURRAY; RUBIN; ROTHERMEL, 1983; VAN *et al.*, 2011). Estas moléculas podem combinar com $NO^{\bullet}$ produzindo $ONOO^{\bullet-}$ que apresenta alto efeito tóxico contra *Leishmania* (VAN *et al.*, 2011). Demonstrou-se que existe uma associação entre os níveis de produção de $O_2^{\bullet-}$ e a capacidade leishmanicida das células do hospedeiro (KHOURI *et al.*, 2009). Diferentes trabalhos na literatura investigaram e demonstraram a importância destes radicais na eliminação de diferentes espécies de *Leishmania*, principalmente consideraram que $NO^{\bullet}$ e ROS são moléculas com atividade microbica contra estes parasitos (LIEW *et al.*, 1990; MURRAY, 1982). $NO^{\bullet}$ é essencial para a eliminação de *L. major*, uma vez que animais

deficientes na expressão da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS^{-/-}) não são capazes de controlar a replicação do parasito e a infecção. Além disso, macrófagos iNOS^{-/-} são incapazes de eliminar as formas amastigotas em cultura (WEI *et al.*, 1995). Macrófagos infectados ou macrófagos previamente ativados com LPG ou GIPL (moléculas purificadas de superfície de *Leishmania*) perdem sua habilidade de expressar iNOS ou de produzir •NO em resposta à citocina IFN-γ e lipopolissacarídeos (LPS) (PROUDFOOT *et al.*, 1996; PROUDFOOT; O'DONNELL; LIEW, 1995). Porém, quando adicionados simultaneamente, IFN-γ e LPG atuam de forma sinérgica em macrófagos *naïve* gerando •NO, sugerindo que o contato prévio entre parasitos e macrófagos impede a resposta quando estes são expostos ao IFN-γ produzido por células linfóides. Em contraste aos animais iNOS^{-/-}, camundongos Phox^{-/-} controlam a infecção por *L. major* de forma semelhante aos WT, entretanto, o controle do parasitismo no baço e nos linfonodos é diretamente dependente de ROS (BLOS *et al.*, 2003). Nesse trabalho ainda foi demonstrado que ROS é essencial na diminuição na reincidência da doença depois de longos períodos após a infecção. Além disto, camundongos Phox^{-/-} conseguem controlar normalmente a infecção por *L. donovani* após o período inicial de crescimento do parasito (MURRAY; NATHAN, 1999), indicando que ROS desempenham um papel menos importante no controle do parasito. Em recente estudo em nosso laboratório, avaliamos o papel das ROS durante a infecção por *L. amazonensis* e verificamos diferenças na carga parasitária e lesão entre animais selvagens e Phox^{-/-} dependendo da via de inoculação do parasito. A infecção intradérmica dos parasitos nas orelhas de camundongos WT ocasionou maior severidade da doença, com aumento progressivo das lesões e carga parasitária, em ambas as linhagens de camundongos. Em contraste, a inoculação subcutânea promoveu crescimento limitado das lesões, e os animais foram capazes de manter a carga parasitária estável por todo o período avaliado. Diante deste quadro de controvérsia a respeito da importância das ROS na infecção por parasitos do gênero *Leishmania* e do escasso número de trabalhos publicados na literatura associando estes radicais e infecções com *L. infantum*, decidimos pela realização do estudo apresentado nesta tese.

Inicialmente, avaliando a explosão respiratória, por ensaio luminométrico em macrófagos, verificamos que as culturas de macrófagos sem nenhum estímulo

produzem níveis muito baixos de $O_2^{\bullet-}$ e, em grande contraste, macrófagos estimulados com zymosan, controle positivo, produziram altos níveis deste radical. Mas o mais importante é que durante a fagocitose de promastigotas de *L. infantum* por macrófagos constatamos que estas formas induziram quantidades consideráveis deste radical (Figura 5D). Estudos demonstraram que a liberação de $O_2^{\bullet-}$ foi induzida na presença de *L. major*, mas não por *L. amazonensis* em culturas de macrófagos de camundongos CBA (ALMEIDA *et al.*, 2012). Além disso, promastigotas de *L. guyanensis* são capazes de induzir explosão respiratória em macrófagos de animais BALB/c e os radicais foram responsáveis pela eliminação, através de apoptose, das formas amastigotas *in vitro* e de maneira independente de $\bullet NO$ (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006). Em relação a uma espécie que causa semelhante infecção visceral, promastigotas de *L. donovani* promovem um atraso na produção de $O_2^{\bullet-}$ interferindo no agrupamento das unidades da enzima NADPH oxidase e na maturação do fagossomo (CHANNON; ROBERTS; BLACKWELL, 1984; LODGE; DESCOTEAUX, 2006; LODGE; DIALLO; DESCOTEAUX, 2006). A inibição parece ser causada por moléculas de LPG e gp63, presentes na superfície do parasito (DESCOTEAUX; TURCO, 1999; SORENSEN; HEY; KHARAZMI, 1994) e a interação estaria relacionada com a atividade anormal da PKC (proteína quinase C) (OLIVIER; BROWNSEY; REINER, 1992).

Em nosso trabalho demonstramos pela primeira vez a capacidade de indução de produção de ROS por macrófagos quando infectados *in vitro* com formas promastigotas de *L. infantum*. A geração de $O_2^{\bullet-}$ dá início a uma cascata de eventos que levam à formação de diferentes radicais intermediários de forma espontânea ou catalisadas por enzimas. Além da produção de $O_2^{\bullet-}$ verificamos o acúmulo de H_2O_2 no sobrenadante de culturas de macrófagos WT infectados e ativados ou não com IFN- γ e LPS. Ainda verificamos que a adição de apocinina, inibidor da NADPH oxidase, foi responsável pela redução dos níveis H_2O_2 nestas culturas, indicando assim que a origem do H_2O_2 foi a partir da conversão do $O_2^{\bullet-}$ produzido na presença da *L. infantum* (Figura 6). A produção de H_2O_2 pode ser um importante fator para a eliminação do parasito em questão, uma vez que experimentos *in vitro* demonstraram o efeito leishmanicida dose-dependente do H_2O_2 contra *L. donovani*, *L. tropica* e *L. infantum* (GOMES *et al.*, 2003). Quando avaliado o mecanismo de morte da *L. donovani* causado pelo H_2O_2 verificou-se que estes radicais induziram morte por apoptose dos

parasitos (DAS; MUKHERJEE; SHAHA, 2001). Uma vez mais, os estudos com *L. major* mostraram que este parasito promoveu acumulação de níveis mais altos de H_2O_2 que a *L. amazonensis* (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A citocina IFN- γ atua como molécula chave para a ativação clássica de fagócitos. Assim, através do metabolismo de L-arginina, macrófagos ativados por esta citocina, em sinergismo com TNF, produzem altos níveis de $\bullet NO$ e são capazes de induzir a morte da *Leishmania* por apoptose (GREEN *et al.*, 1990a; GREEN *et al.*, 1990b; HOLZMULLER *et al.*, 2002; HOLZMULLER; BRAS-GONCALVES; LEMESRE, 2006), assim como outros parasitos intracelulares, como *T. gondii* e *T. cruzi* (LANGERMANS *et al.*, 1992; VESPA; CUNHA; SILVA, 1994). Em nossos experimentos somente macrófagos ativados por IFN- γ e LPS foram capazes de produzir $\bullet NO$ e sem participação dos parasitos (Figura 7). Ainda verificamos que macrófagos WT e $Phox^{-/-}$ foram capazes de produzir quantidades semelhantes deste radical e mostrando assim que não ocorre compensação na produção de $\bullet NO$ nos macrófagos de animais $Phox^{-/-}$ pela falta de $O_2\bullet^-$.

Quando ativamos macrófagos com IFN- γ e LPS e infectamos as células com *L. infantum* observamos produção de $O_2\bullet^-$ e $\bullet NO$. Pela presença simultânea destes radicais espera-se que seja produzido $ONOO^-$, já que eles podem reagir entre si espontaneamente. Assim, em nossas culturas de macrófagos WT ativados e infectados houve produção de $ONOO^-$ detectada pela oxidação da sonda CBA. Os níveis de $ONOO^-$ foram diminuídos pela adição de apocinina e foram drasticamente reduzidos aos níveis basais pela adição do inibidor da enzima iNOS, indicando que o principal fator limitante da produção de $ONOO^-$ é a presença de $\bullet NO$. A adição de catalase e superóxido dismutase, isoladamente, não alterou a produção de $ONOO^-$, porém a ação conjunta destes compostos comprometeu sua detecção (Figura 8A e B). Desta forma, ficou evidenciada a presença do $ONOO^-$ induzidos pela *L. infantum*. Quando comparados os níveis de $ONOO^-$ entre macrófagos de animais WT, $Phox^{-/-}$ e $iNOS^{-/-}$ verificamos que somente os macrófagos WT foram capazes de produzir níveis significativos deste radical (Figura 8C). De nosso conhecimento não existem relatos da produção de peroxinitrito em infecções *in vitro* com *L. infantum*.

Finalmente, mostramos que em conjunto estes radicais participaram na eliminação dos parasitos em cultura com redução da porcentagem de parasitos e do número de parasitos nos macrófagos infectados (Figura 9). Verificamos que ocorreu diminuição da porcentagem de macrófagos ativados e infectados após 72 horas de cultura nas três linhagens de camundongos, apesar desta diminuição ter sido menos afetada nos macrófagos iNOS^{-/-}. O fato de que os macrófagos não ativados e infectados foram capazes de manter a porcentagem de infecção, no caso dos macrófagos Phox^{-/-}, ou diminuir esta porcentagem, em WT e iNOS^{-/-}, neste tempo, nos fez imaginar que pode ter ocorrido uma alta proliferação do parasito seguido de morte dos macrófagos, já que utilizamos a relação de dez parasitos para um macrófago na infecção. Há muito se discute na literatura a produção ROS estimulada por parasitos como *Leishmania* e *T. cruzi* e seus efeitos na morte dos parasitos. Já foi demonstrado que promastigotas de *Leishmania* são susceptíveis à exposição ao O₂^{•-} e ao radical hidroxila (OH[•]) gerado a partir de H₂O₂ (MILLER *et al.*, 2000; ZARLEY; BRITIGAN; WILSON, 1991). Linares *et al.*, (2001) demonstraram que a viabilidade celular de amastigotas de *L. amazonensis* foi afetada pelo peroxinitrito de maneira dose-dependente, mas sem maiores efeitos por doadores de •NO. Esses dados sugerem assim que o peroxinitrito é um agente efetor da eliminação deste parasito (LINARES *et al.*, 2001). Em grande contraste, recente estudo demonstrou alta resistência das formas amastigotas de *L. amazonensis* aos efeitos do ONOO⁻ produzido por macrófagos ativados por citocinas, pela maior expressão da enzima antioxidante tryparedoxina peroxidase (TXNPx) (HENARD *et al.*, 2014). As peroxiredoxinas são enzimas altamente conservadas, encontradas desde bactérias até humanos. Suas isoformas foram descritas e caracterizadas com diferente expressão nas formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. A presença desta enzima nos parasitos seria um dos fatores relevantes para a sua sobrevivência no interior das células hospedeiras (BARR; GEDAMU, 2003). Assim, nos questionamos se a cepa utilizada em nossos experimentos poderia apresentar deficiência na expressão do conjunto de enzimas antioxidantes e por isto seria mais susceptível à ação das ROS. Este fato é de extrema relevância e precisa de maiores investigações. Este radical altamente tóxico é microbicida em infecções *in vitro* com a forma tripomastigota infectiva de *T. cruzi*, sendo sua presença detectada no fagossomo contendo o parasita, promovendo

alterações na ultraestrutura do parasito incluindo compacta condensação do DNA nuclear e mitocondrial, intensa vacuolização citoplasmática e comprometimento da integridade da membrana celular (ALVAREZ *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos para a determinação da produção de ROS foi feita em experimentos *in vitro* sendo estes importantes para a descoberta de diferentes vias pelas quais as infecções por *Leishmania* estão envolvidas. A transposição destes dados para experimentos *in vivo* pode ser complicada, pois nestes sistemas existem muito mais fatores que podem influenciar na dinâmica da interação do parasito com o hospedeiro. A via de inoculação do parasito por agulha pode significativamente influenciar o resultado da infecção por *Leishmania* (MAHMOUDZADEH-NIKNAM *et al.*, 2013; NABORS *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2012b; OSORIO *et al.*, 2003; TABBARA *et al.*, 2005). Essas alterações estão diretamente relacionadas com o perfil celular atraído para o local do inóculo dos parasitos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2014). Não existem muitos relatos na literatura avaliando o recrutamento celular e a resposta imune durante os estágios iniciais da infecção em diferentes sítios da inoculação da *Leishmania*. Há grandes controvérsias a respeito dos diferentes tipos celulares e dos componentes moleculares envolvidos na resistência às leishmanioses. O emprego de diferentes vias de inoculação dos parasitos complica ainda mais a interpretação dos resultados (LIMA *et al.*, 1998; PETERS *et al.*, 2008; SMELT *et al.*, 2000; TACCHINI-COTTIER *et al.*, 2000; THALHOFER *et al.*, 2011). Além do mais, a maioria dos estudos sobre a resposta imune desenvolvida em diferentes locais de inoculação do parasito é relacionada com estudos de vacinas onde apenas o segundo desafio estudado é amplamente detalhado. Na verdade, o local do primeiro desafio nestes estudos influencia o segundo desafio e a resposta imune pode ser bastante diferente dependendo do local que foi usado na inoculação (TABBARA *et al.*, 2005). O efeito da via de inoculação do parasito no resultado da infecção foi relatado para *L. major* (NABORS *et al.*, 1995), *L. donovani* (KAUR *et al.*, 2008b) e *L. tropica* (MAHMOUDZADEH-NIKNAM *et al.*, 2013). Vários dos trabalhos envolvendo *L. infantum* utilizam a via endovenosa ou intraperitonial como forma de introdução do parasito no organismo do hospedeiro, pois buscam investigar os aspectos imunológicos relacionando a presença do parasito nos principais órgãos de destino deste, como fígado, baço e medula óssea. Portanto, esta via de infecção não serve

para a avaliação da interação inicial entre parasito-hospedeiro com consequente desenvolvimento de resposta imune de forma que reproduza a infecção natural. A inoculação intradérmica por agulha na orelha de camundongos tem sido amplamente empregada como via de infecção que mais proximamente reproduz a deposição intradérmica e intraepidérmica dos parasitos pela picada de flebotomíneos infectados. Ribeiro-Gomes et al. (2014) demonstraram que o infiltrado celular atraído pela picada do vetor é similar e reprodutível quando se faz a infecção intradérmica com agulha na orelha ou mesmo na pata. Desta forma, faz-se necessário o esforço da investigação para reproduzir o local natural da inoculação do parasito visando a interação imediatamente após o início da infecção e as significantes consequências para o estabelecimento desta.

Seguindo a infecção com *L. infantum*, o grau pelo qual diferentes células inatas fagocíticas internalizam o parasito e são permissivas ou não à sobrevivência e crescimento destes pode influenciar significativamente no resultado da infecção. A capacidade de gerar diferentes espécies de oxigênio está diretamente ligada a este fator. Avaliando a carga parasitária no curso inicial da infecção intradérmica com *L. infantum* entre animais WT, *Phox^{-/-}* e *iNOS^{-/-}*, observamos que os camundongos *Phox^{-/-}* apresentaram maior carga parasitária por todo o curso infecção avaliada entre seis horas e 72 horas. Apresentaram pico 12 horas após a inoculação dos parasitos quando comparados com os animais WT e *iNOS^{-/-}* (Figura 10). A carga parasitária nos três grupos avaliados foi reduzindo lentamente até o tempo de 72 horas após a inoculação do parasito sendo sempre menor nos animais WT e seguido dos *iNOS^{-/-}*. Esses dados apontam para a relevância da produção de ROS nos estágios iniciais da infecção. Uma vez que observamos essa importante diferença no controle da replicação do parasito até 72h após a infecção na ausência da produção de ROS decidimos investigar se o infiltrado celular também poderia estar diferente entre as linhagens. Comparando o influxo inicial de células fagocíticas expressando o marcador CD11b⁺ verificamos que houve um aumento gradual na porcentagem destas células nos três grupos, porém no tempo de 12 horas os animais *Phox^{-/-}* apresentaram um maior percentual em relação aos outros dois grupos estudados. O número absoluto destas células foi similar entre animais WT e *iNOS^{-/-}* com aumento após seis horas e permanecendo constante até o final do tempo avaliado. Mais uma vez os

animais $\text{Phox}^{-/-}$ apresentaram maior número de células CD11b^{+} 12 horas após a infecção, mas seguido de queda e estabilização destes números de forma comparável aos WT e $\text{iNOS}^{-/-}$. (Figura 10A e B). A caracterização das células fagocíticas presentes no infiltrado mostrou que a frequência de neutrófilos, dentro da população CD11b^{+} é maior nos animais $\text{Phox}^{-/-}$ e ainda, comparando a frequência de neutrófilos infectados dentro do total da população de CD11b^{+} infectada vimos a mesma relação. Nossos resultados mostraram que ocorreu um rápido e massivo recrutamento de neutrófilos iniciado logo após a inoculação de *L. infantum*, alcançando o pico 12 horas depois, em camundongos WT, $\text{Phox}^{-/-}$ e $\text{iNOS}^{-/-}$. Neste tempo verificamos o pico na porcentagem e no número absoluto de neutrófilos evidenciando a diferença entre os animais $\text{Phox}^{-/-}$, WT e $\text{iNOS}^{-/-}$ e indicando uma forte influência dos produtos da NADPH oxidase na migração de neutrófilos (Figuras 14A e 15A). Camundongos $\text{Phox}^{-/-}$ apresentaram maior carga parasitária na orelha, maior número de neutrófilos e estes neutrófilos foram as células que, numericamente, mais carregavam os parasitos (Figura 19 A). No trabalho de Thalhoffer et al. (2001), que analisa somente o recrutamento celular sem relacionar com ROS, também ocorre um infiltrado neutrofílico imediato após inoculação do parasito e o maior número de células ocorrendo 6 horas na cinética. Paralelamente ao aumento e predominância destas, a maioria das células infectadas durante as 24 horas iniciais eram neutrófilos. Infelizmente, falta neste estudo o tempo de 12 horas para compararmos com os nossos dados. Provavelmente a adição deste tempo no curso inicial da infecção mostraria perfil do infiltrado de neutrófilos semelhante ao encontrado em nossas infecções com *L. infantum* ou em trabalhos com *L. major*. Recentemente, um estudo mostrou que neutrófilos, sendo recrutados rapidamente para a derme, eficientemente capturam promastigotas metacíclicos de *L. major* e iniciam o processo de apoptose e em seguida são fagocitados por células dendríticas (PETERS et al., 2008; RIBEIRO-GOMES et al., 2012). A maior participação de neutrófilos no infiltrado inicial da infecção pode ser determinante para o desenvolvimento da doença nos camundongos $\text{Phox}^{-/-}$, uma vez que essas células, além de serem as primeiras células hospedeiras do parasito, podem ser susceptíveis a eles (PETERS et al., 2008). Verificamos ainda que ocorreu maior produção de CXCL1 e CXCL2 em camundongos $\text{Phox}^{-/-}$ que seriam responsáveis pela atração de neutrófilos para o local de inflamação. Os níveis de

produção destas quimiocinas acompanharam o pico de migração dos neutrófilos. No entanto, após o período de 12 horas ocorreu queda na produção destas quimiocinas nos três grupos avaliados e os níveis se igualaram até o final do tempo analisado. Não observamos diferenças entre as três linhagens de camundongos na produção de CCL-2 (MCP-1). Em nosso laboratório, nas infecções com *L. amazonensis* na orelha de animais WT e *Phox^{-/-}*, não foram encontradas diferenças nos níveis de expressão do mRNA de CXCL1 após quatro semanas de infecção. No entanto, no mesmo tempo, houve maior expressão do mRNA de CXCL2 nos animais *Phox^{-/-}* (dados não publicados). Isto indica que ocorre modulação diferencial da produção de quimiocinas induzida tanto por ROS quanto pela espécie de *Leishmania* utilizada na infecção. Utilizando neutrófilos do lavado pulmonar de camundongos verificou-se que CXCL1 foi essencial para a regulação da produção de ROS por estas células em infecções com a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (BATRA *et al.*, 2012). Este fato poderia ajudar a explicar a diminuição na carga parasitária nos camundongos WT e *iNOS^{-/-}* mesmo estes animais não apresentando os maiores níveis de produção desta quimiocina.

O ambiente nesta fase inicial poderia favorecer o recrutamento de células inflamatórias para a orelha através da liberação das quimiocinas liberadas após o dano causado pela utilização da agulha. Grupos de neutrófilos fazem vigília nos capilares sanguíneos, através de interações temporárias, rolando nas células endoteliais e buscando por sinais nos tecidos, mucosas, músculo esquelético e órgãos linfáticos por sinais de danos nos tecidos, inflamação ou micro-organismos invasores (LAWRENCE; SPRINGER, 1991; RICHTER *et al.*, 2004; ZARBOCK; LEY, 2009). Estes neutrófilos, rolando nas paredes destes vasos, buscam por sinais quimiotáticos ou quimioatraentes fornecidos pelo hospedeiro ou por patógenos. Após o dano ou invasão por estes patógenos, diferentes tipos celulares do hospedeiro, que podem incluir monócitos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, queratinócitos células endoteliais e epiteliais, começam a induzir a produção e secreção de mediadores inflamatórios como as quimiocinas relacionadas à atração de neutrófilos. Entre eles, podem ser citados interleucina-8 (IL-8), CXCL1, CXCL2, CXCL6 e leucotrieno B4 (LTB 4). Esses mediadores ligam-se a receptores específicos na superfície celular de neutrófilos, aumentando sua capacidade de adesão e consequente migração para o tecido. Estes sinais induzem a saída dos neutrófilos presentes na circulação para os

tecidos danificados ou infectados. Assim, ocorre um rápido influxo destas células e consequente acúmulo nestes tecidos. Em infecções causadas por *Leishmania*, o dano promovido pela introdução da agulha ou mesmo o dano causado pela picada do flebotomíneo é suficiente para causar a migração de neutrófilos. Entretanto, o dano induzido pela picada do vetor parece promover maior migração e acumulação de neutrófilos no local da picada (PETERS *et al.*, 2008). A injeção por agulha causa danos consideráveis nas camadas pele da orelha. Consequentemente, estes danos causam rupturas de células e liberação de conteúdo intracelular na matriz extracelular. Estes componentes citoplasmáticos podem ligar aos receptores de padrões moleculares associados a danos teciduais (DAMPs) localizados nas superfícies de células epiteliais iniciando a resposta inflamatória. Independente do dano causado pela inoculação, a injeção de veículo contendo o parasito aumenta a pressão sobre as camadas celulares da pele, que contribuem para a ruptura do tecido e consequente inflamação, no entanto, a inoculação somente de salina na orelha de camundongos demonstrou migração inicial dos neutrófilos e foi associada ao dano no tecido causado pela agulha, já que ocorreu diminuição do número de neutrófilos nos tempos seguintes (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012). Desta forma consideramos que a migração celular encontrada em nossos experimentos é diretamente associada à presença dos parasitos e influenciada grandemente pelas espécies reativas de oxigênio.

ROS podem desempenhar importantes papéis na biologia de neutrófilos, como sendo um dos principais fatores responsáveis pela indução de apoptose. O papel da NADPH oxidase como principal indutor da produção de ROS durante a apoptose espontânea vem de observações de neutrófilos de pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC) que não possuem a enzima funcional. Vários relatos mostraram que neutrófilos de pacientes com DGC apresentam sobrevivência elevada quando comparados com neutrófilos de doadores saudáveis (CONUS *et al.*, 2008; FADEEL *et al.*, 1998b; KASAHARA *et al.*, 1997b; SANMUN *et al.*, 2009; VON *et al.*, 2005). Peróxido de hidrogênio foi capaz de induzir apoptose e seu efeito foi revertido pela ação da catalase em blastocistos (PIERCE; PARCHMENT; LEWELLYN, 1991). Além da catalase, os altos níveis do antioxidante glutathiona intracelular tiveram efeito contrário no desencadeamento de apoptose por ROS. Mais ainda, vários autores mostraram que ROS pode induzir apoptose em diferentes sistemas celulares. Assim

como descrito para blastocistos, H_2O_2 induziu apoptose em neutrófilos e esta indução foi afetada pela catalase (KASAHARA *et al.*, 1997a). Assim, foi sugerido que H_2O_2 pode ser um importante fator para indução de morte de neutrófilos por apoptose e, consequentemente, responsável pelo curto tempo de vida destas células.

A família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) e fator de crescimento nervoso (NGF) desempenham múltiplas funções, variando desde o crescimento celular até diferenciação e morte celular (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; WALLACH *et al.*, 1999). Um subgrupo particular desta família induz apoptose em diferentes modelos e eles são denominados receptores de morte. Apesar da presença de motivos ricos em cisteína encontrados no domínio extracelular em todos os membros da família de receptores TNF/NGF, os receptores de morte contêm uma sequência adicional comum em seus domínios citoplasmáticos chamados domínios de morte. Este domínio de morte é necessário e suficiente para induzir a morte através de mecanismos dependentes de caspase (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; WALLACH *et al.*, 1999). Os receptores de morte promovem a morte celular através de mecanismos dependentes de caspase, entretanto parece que a geração de ROS é igualmente importante neste processo, mesmo que seu envolvimento ainda não esteja totalmente esclarecido.

A ação das diferentes ROS sobre diferentes alvos celulares não foi completamente identificada. Ocorre ativação da enzima esfingomielinase ácida em neutrófilos, resultando em aumento dos níveis de ceramidas que, por sua vez, aumentam a atividade de caspase-3, -8 e -9, levando as células a apoptose (SCHEEL-TOELLNER *et al.*, 2004). ROS tem importante papel na apoptose de neutrófilos durante processos inflamatórios, já que participam e interferem nas vias integradas das cascatas de sinalização apoptóticas.

Em relação à participação da *Leishmania* na apoptose de neutrófilos, os relatos parecem ser inconsistentes pois foi observada expressão retardada ou aumentada de fosfatidilserina nos neutrófilos obtidos de sangue humano ou peritoneais de camundongos expostos a *Leishmania in vitro* (AGA *et al.*, 2002; GUEIRARD *et al.*, 2008). O atraso da apoptose espontânea destas células é feita via redução da atividade de caspase-3 (AGA *et al.*, 2002). Também foi demonstrado que macrófagos

humanos interagem com neutrófilos apoptóticos infectados, mas não com neutrófilos necróticos infectados com *L. amazonensis* (AFONSO *et al.*, 2008). Em nossos experimentos, observamos que a infecção por *L. infantum* aumentou a porcentagem de neutrófilos em apoptose e necrose quando comparados com os neutrófilos não infectados (Figura 21A e B). Todavia, constatamos que ao longo do tempo o número de neutrófilos em apoptose foi diminuindo, indicando uma interferência neste processo pela *L. infantum*. Contudo, não ocorreram diferenças na porcentagem e no número de neutrófilos em apoptose induzidos pela presença da *L. infantum* quando comparamos células de animais WT e *Phox^{-/-}* (Figura 23A e C e Figura 24A e C). Em contraste, verificamos que a presença do parasito e a ausência de ROS induziram a morte de neutrófilos preferencialmente por necrose (Figura 23 D e Figura 22A e D). No tempo de 12 horas não houve diferenças entre os grupos, mas 24 horas após a infecção verificamos os maiores índices de necrose de neutrófilos nas orelhas de animais *Phox^{-/-}* quando comparado com animais WT. Estes dados foram comprovados pelo exame da área de necrose em análise do corte histológico (Figura 25C e D). O extravasamento do conteúdo celular durante o processo de necrose causa a liberação de proteínas citoplasmáticas no ambiente extracelular. No caso específico dos neutrófilos, este processo libera, entre outras proteínas, proteases que são altamente danosas e causam destruição da matriz extracelular e causa a necrose. A necrose de neutrófilos, por ser um processo altamente inflamatório e, nos animais deficientes na produção de ROS, pode ser o fator responsável pela manutenção da maior porcentagem e número destas células nos tempos entre 24 horas e 72 horas de infecção.

Neutrófilos foram extensivamente estudados nos diferentes contextos das infecções por *Leishmania* nos últimos anos. Todavia, resultados contraditórios foram encontrados para seu papel no controle da doença causado por *L. major* (PETERS; SACKS, 2009). Estes resultados contraditórios podem ser atribuídos a muitas variáveis, como o uso de diferentes linhagens de camundongos, local da infecção, diferentes quantidades de parasitos inoculados, diferentes cepas do parasito entre outros. Encontramos diferenças substanciais no recrutamento celular e nas células envolvidas na fagocitose da *Leishmania*. A infecção intradérmica foi marcadamente caracterizada pelo recrutamento de células inflamatórias como neutrófilos seguido de

monócitos. O aumento do número de monócitos foi ligeiramente retardado no início da infecção e aumentou gradualmente a partir de 12 horas de infecção até 72 horas nos animais WT e iNOS^{-/-}. Todavia, nos animais Phox^{-/-} após um aumento em 12 horas, ocorreu uma queda no número destas células sendo sempre menor em relação aos outros dois grupos (Figura 11B). Quando comparado o número de monócitos infectados observamos maior número de monócitos de animais WT e iNOS^{-/-} infectados em relação aos Phox^{-/-} nos tempos de 24 a 72 horas. Assim, constatamos claramente que houve diferenças na migração de monócitos entre as três linhagens de camundongos. Interessantemente observamos que houve uma relação entre a persistência e manutenção de neutrófilos nos tempos entre 24 e 72 horas nos animais Phox^{-/-} e um atraso na chegada de monócitos nestes animais. A ausência de ROS parece modular a migração das células inatas presentes no local da infecção. Este ambiente altamente inflamatório culminou em uma fagocitose mais eficiente do parasito, com neutrófilos sendo as células mais importantes envolvidas nos tempos iniciais da infecção e, em seguida, nos demais tempos os monócitos passaram a predominar e estavam mais infectados. Não observamos diferenças na migração de células dendríticas e macrófagos entre os grupos de camundongos ao longo do tempo. E ainda não houve diferenças em relação à porcentagem e números destas células infectadas por *L. infantum*. A subpopulação de monócitos inflamatórios e as células dendríticas são recrutadas para os locais de infecção dérmica causada por *L. major* e foram relacionadas na indução da resposta do tipo T_H1 (LEON; LOPEZ-BRAVO; ARDAVIN, 2007). Foi demonstrado que células dendríticas CD11b⁺Ly6C⁺CD11c⁺ produtoras de TNF e iNOS são recrutadas para o local da infecção de maneira dependente de CCR2, embora não seja claro se o receptor está envolvido em algum outro processo além da saída das células da medula óssea. Estas células recrutadas provavelmente são derivadas de monócitos LY6C^{hi} circulantes e carregam a maioria dos parasitos nas lesões cutâneas e nos linfonodos (DE *et al.*, 2009). Os estudos feitos inoculando formas metacíclicas de *L. major* na cavidade peritoneal de camundongos verificaram que monócitos foram as células com maior frequência neste local e não os neutrófilos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2014). Já estudos *in vitro* utilizando monócitos GR1⁻ e GR1⁺ de animais WT verificaram que estas células foram capazes de produzir superóxido quando na presença de promastigotas de *L. major*, já os monócitos de

animais $Phox^{-/-}$ não foram capazes de eliminar os parasitos (GONCALVES *et al.*, 2011). Monócitos $LY6C^{hi}$ induzidos pela infecção por *L. major* podem eliminar o parasito *in vitro* produzindo $\bullet NO$ (PEREIRA *et al.*, 2011). Ao tentar relacionar nossos resultados com os relatos acima podemos inferir que o maior aumento na população de monócitos nos tempos a partir de 24 horas nos animais WT e a diminuição da carga parasitária nos mesmos deve estar diretamente associada à capacidade destas células produzirem ROS.

Considerando-se a produção de ROS pelos diferentes tipos celulares envolvidos verificamos que a ausência de ROS foi responsável por alterar a dinâmica do infiltrado celular, levando à persistência dos neutrófilos em porcentagem e em número maior a partir de 24 horas até o final. Neste sentido, a deficiência de $\bullet NO$ parece não ter relevância, pois o perfil do infiltrado nos animais $iNOS^{-/-}$ seguiu de forma geral semelhante ao do selvagem. Sendo os neutrófilos a principal população de células envolvida na explosão respiratória gerando assim ROS para a eliminação dos parasitos e ainda sendo estas células recrutadas massivamente para o local da infecção, demonstramos claramente que nos estágios iniciais da infecção a migração sofre regulação pela presença de espécies reativas de oxigênio.

Nossos dados sugerem, pela primeira vez, que ROS são importantes no controle do parasitismo em macrófagos e nos tempos iniciais da infecção por *L. infantum* regulando o recrutamento de neutrófilos, além de outras células da resposta imune inata, sem influência na apoptose destas células, mas responsáveis por controlar a inflamação evitando a necrose das células.

7 - CONCLUSÃO

Os efeitos das diferentes espécies reativas de oxigênio nas infecções por *Leishmania* podem variar de acordo com a linhagem de camundongo usado, a espécie do parasito e as condições em que os experimentos foram realizados. Assim, em conclusão, nossos dados demonstraram que diferentes ROS são importantes ferramentas efetoras na eliminação de *L. infantum in vitro* e na modulação da resposta imune inata inicial na infecção intradérmica de camundongos C57BL/6 por *L. infantum*.

Mostramos que macrófagos infectados são capazes de produzir $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Mais ainda, quando ativados e infectados, macrófagos produzem $\bullet NO$ e $ONOO^-$ em quantidades que foram suficientes para a eliminação das formas amastigotas de *L. infantum*. A produção destes diferentes radicais foi alterada pela presença de inibidores da enzima NADPH oxidase e da óxido nítrico sintase indutível. Os índices de infecção *in vitro* foram diferentes em macrófagos $Phox^{-/-}$ e $iNOS^{-/-}$ comparados com os WT. Sugerimos, pela primeira vez, que $ONOO^-$ contribui efetivamente para eliminação do parasito *in vitro*.

Mostramos que a deficiência na expressão da proteína $gp91^{PHOX}$, e consequente inativação da enzima NADPH oxidase e não produção de $O_2^{\cdot-}$ e outros intermediários, foi responsável pela maior carga parasitária no modelo de infecção intradérmica nas orelhas, tornando os animais $Phox^{-/-}$ mais permissivos ao parasito nos tempos iniciais da infecção. Esta deficiência ainda promoveu uma migração celular diferencial, caracterizada pelo predomínio de neutrófilos e atraso na migração de monócitos. Mostramos que a falta destes radicais interferiu na produção das quimiocinas CXCL1 e CXCL2. Seus níveis elevados nos animais $Phox^{-/-}$ contribuíram para o aumento de neutrófilos até 12 horas após o inóculo do parasito. E ainda, mostramos que os neutrófilos infectados de animais $Phox^{-/-}$ apresentaram maiores índices de necrose. Caracterizamos o perfil de células infectadas por *L. infantum* ao longo dos estágios iniciais da infecção, mostrando a transição pelos neutrófilos, nas primeiras horas, para os monócitos e para células não inflamatórias nos tempos finais da infecção. Sugerimos, então, que ROS desempenham importante papel no controle do parasitismo *in vivo*, modulam a migração das células da resposta imune inata,

principalmente neutrófilos e monócitos, através da regulação da produção de quimiocinas e do controle dos índices de apoptose e necrose de neutrófilos. A produção de ROS pode estar diretamente relacionada às divergências encontradas na literatura a respeito da função dos neutrófilos nos diferentes modelos de infecção por *Leishmania*.

8 - BIBLIOGRAFIA

AFONSO, L.; BORGES, V. M.; CRUZ, H.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; DOSREIS, G. A.; DUTRA, A. N.; CLARENCIO, J.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. I. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J.Leukoc.Biol.*, v. 84, n. 2, p. 389-396, 2008

AGA, E.; KATSCHINSKI, D. M.; VAN, Zandbergen G.; LAUFS, H.; HANSEN, B.; MULLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J.Immunol.*, v. 169, n. 2, p. 898-905, 2002

ALMEIDA, T. F.; PALMA, L. C.; MENDEZ, L. C.; NORONHA-DUTRA, A. A.; VERAS, P. S. *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. *Parasite Immunol.*, v. 34, n. 10, p. 492-498, 2012

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.*, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. *Adv.Parasitol.*, v. 57, n. 1-88, 2004

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN, Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS.One.*, v. 7, n. 5, p. e35671-2012

ALVARENGA, J. S.; LIGEIRO, C. M.; GONTIJO, C. M.; CORTES, S.; CAMPINO, L.; VAGO, A. R.; MELO, M. N. KDNA genetic signatures obtained by LSSP-PCR analysis of *Leishmania (Leishmania) infantum* isolated from the new and the old world. *PLoS.One.*, v. 7, n. 8, p. e43363-2012

ALVAREZ, B.; RADI, R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino.Acids*, v. 25, n. 3-4, p. 295-311, 2003

ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; PIACENZA, L.; RADI, R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J.Biol.Chem.*, v. 286, n. 8, p. 6627-6640, 2011

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, v. 281, n. 5381, p. 1305-1308, 1998

ASSREUY, J.; CUNHA, F. Q.; EPPERLEIN, M.; NORONHA-DUTRA, A.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur.J.Immunol.*, v. 24, n. 3, p. 672-676, 1994

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. *Blood*, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, 1999

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. *Curr.Opin.Immunol.*, v. 16, n. 1, p. 42-47, 2004

BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D., Jr. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J.Infect.Dis.*, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.*, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008

BANULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv.Parasitol.*, v. 64, n. 1-109, 2007

BARR, S. D.; GEDAMU, L. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J.Biol.Chem.*, v. 278, n. 12, p. 10816-10823, 2003

BATES, P. A. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp.Parasitol.*, v. 79, n. 2, p. 215-218, 1994

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int.J.Parasitol.*, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007

BATRA, S.; CAI, S.; BALAMAYOORAN, G.; JEYASEELAN, S. Intrapulmonary administration of leukotriene B(4) augments neutrophil accumulation and responses in the lung to *Klebsiella* infection in CXCL1 knockout mice. *J.Immunol.*, v. 188, n. 7, p. 3458-3468, 2012

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.*, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007

BLACKWELL, J. M.; ROACH, T. I.; KIDERLEN, A.; KAYE, P. M. Role of Lsh in regulating macrophage priming/activation. *Res.Immunol.*, v. 140, n. 8, p. 798-805, 1989

BLOS, M.; SCHLEICHER, U.; SOARES ROCHA, F. J.; MEISSNER, U.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Organ-specific and stage-dependent control of Leishmania major infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur.J.Immunol.*, v. 33, n. 5, p. 1224-1234, 2003

BRAY, R. S. Leishmania. *Annu.Rev.Microbiol.*, v. 28, n. 0, p. 189-217, 1974

BROWN, J. R.; GOLDBLATT, D.; BUDDLE, J.; MORTON, L.; THRASHER, A. J. Diminished production of anti-inflammatory mediators during neutrophil apoptosis and macrophage phagocytosis in chronic granulomatous disease (CGD). *J.Leukoc.Biol.*, v. 73, n. 5, p. 591-599, 2003

CALEGARI-SILVA, T. C.; PEREIRA, R. M.; DE-MELO, L. D.; SARAIVA, E. M.; SOARES, D. C.; BELLIO, M.; LOPES, U. G. NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in Leishmania amazonensis macrophage infection. *Immunol.Lett.*, v. 127, n. 1, p. 19-26, 2009

CAMPBELL, S. M.; RAINEY, P. M. Leishmania pifanoi: kinetics of messenger RNA expression during amastigote to promastigote transformation in vitro. *Exp.Parasitol.*, v. 77, n. 1, p. 1-12, 1993

CARRION, J. Mechanisms of immunity to Leishmania major infection in mice: the contribution of DNA vaccines coding for two novel sets of histones (H2A-H2B or H3-H4). *Comp Immunol.Microbiol.Infect.Dis.*, v. 34, n. 5, p. 381-386, 2011

CARTA, S.; CASTELLANI, P.; DELFINO, L.; TASSI, S.; VENE, R.; RUBARTELLI, A. DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes. *J.Leukoc.Biol.*, v. 86, n. 3, p. 549-555, 2009

CARTER, K. C.; HUTCHISON, S.; BOITELLE, A.; MURRAY, H. W.; SUNDAR, S.; MULLEN, A. B. Sodium stibogluconate resistance in Leishmania donovani correlates with greater tolerance to macrophage antileishmanial responses and trivalent antimony therapy. *Parasitology*, v. 131, n. Pt 6, p. 747-757, 2005

CHANNON, J. Y.; ROBERTS, M. B.; BLACKWELL, J. M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*, v. 53, n. 2, p. 345-355, 1984

CONUS, S.; PEROZZO, R.; REINHECKEL, T.; PETERS, C.; SCAPOZZA, L.; YOUSEFI, S.; SIMON, H. U. Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. *J.Exp.Med.*, v. 205, n. 3, p. 685-698, 2008

COXON, A.; RIEU, P.; BARKALOW, F. J.; ASKARI, S.; SHARPE, A. H.; VON ANDRIAN, U. H.; ARNAOUT, M. A.; MAYADAS, T. N. A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*, v. 5, n. 6, p. 653-666, 1996

CROCKER, P. R.; BLACKWELL, J. M.; BRADLEY, D. J. Expression of the natural resistance gene *Lsh* in resident liver macrophages. *Infect.Immun.*, v. 43, n. 3, p. 1033-1040, 1984

DALY, C.; ROLLINS, B. J. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation*, v. 10, n. 3-4, p. 247-257, 2003

DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J.Cell Sci.*, v. 114, n. Pt 13, p. 2461-2469, 2001

DE, Filippo K.; HENDERSON, R. B.; LASCHINGER, M.; HOGG, N. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J.Immunol.*, v. 180, n. 6, p. 4308-4315, 2008

DE, Trez C.; MAGEZ, S.; AKIRA, S.; RYFFEL, B.; CARLIER, Y.; MURAILLE, E. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania* major infection phase of C57BL/6 resistant mice. *PLoS.Pathog.*, v. 5, n. 6, p. e1000494-2009

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

DUNSTAN, C. A.; SALAFRANCA, M. N.; ADHIKARI, S.; XIA, Y.; FENG, L.; HARRISON, J. K. Identification of two rat genes orthologous to the human interleukin-8 receptors. *J.Biol.Chem.*, v. 271, n. 51, p. 32770-32776, 1996

EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br.J.Nutr.*, v. 85 Suppl 2, n. S67-S74, 2001

EVANS, T. G. Leishmaniasis. *Infect.Dis.Clin.North Am.*, v. 7, n. 3, p. 527-546, 1993a

EVANS, T. G. Leishmaniasis. *Infect.Dis.Clin.North Am.*, v. 7, n. 3, p. 527-546, 1993b

FADEEL, B.; AHLIN, A.; HENTER, J. I.; ORRENIUS, S.; HAMPTON, M. B. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood*, v. 92, n. 12, p. 4808-4818, 1998a

FADEEL, B.; AHLIN, A.; HENTER, J. I.; ORRENIUS, S.; HAMPTON, M. B. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood*, v. 92, n. 12, p. 4808-4818, 1998b

FERRARI, C. K.; SOUTO, P. C.; FRANCA, E. L.; HONORIO-FRANCA, A. C. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)*, v. 59, n. 6, p. 441-448, 2011

FREITAS, V. C.; PARREIRAS, K. P.; DUARTE, A. P.; SECUNDINO, N. F.; PIMENTA, P. F. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 86, n. 4, p. 606-612, 2012

GAMA, M. E.; COSTA, J. M.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 8, p. 889-893, 2004

GAMBERALE, R.; GIORDANO, M.; TREVANI, A. S.; ANDONEGUI, G.; GEFFNER, J. R. Modulation of human neutrophil apoptosis by immune complexes. *J.Immunol.*, v. 161, n. 7, p. 3666-3674, 1998

GEISZT, M.; KAPUS, A.; NEMET, K.; FARKAS, L.; LIGETI, E. Regulation of capacitative Ca^{2+} influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease. *J.Biol.Chem.*, v. 272, n. 42, p. 26471-26478, 1997

GHOSH, A. K.; GHOSH, D. K. Infection pattern of leishmaniasis in hamsters produced by recent isolates from kala-azar patients in India. *Indian J.Med.Res.*, v. 86, n. 14-19, 1987

GHOSH, E. E.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; FUKUHARA, T.; YANG, Y.; MONACK, D. M.; BORTOLUCI, K. R.; ALMEIDA, S. R.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 107, n. 6, p. 2568-2573, 2010

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P. T.; PEREIRA, J. M.; RILEY, L. W.; WILSON, M. E.; HO, J. L.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC.Infect.Dis.*, v. 7, n. 7-2007

GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES, Rda S.; WIETZERBIN, J.; DE FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes.Infect.*, v. 5, n. 4, p. 251-260, 2003

GONCALVES, R.; ZHANG, X.; COHEN, H.; DEBRABANT, A.; MOSSER, D. M. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania* major infection. *J.Exp.Med.*, v. 208, n. 6, p. 1253-1265, 2011

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int.J.Parasitol.*, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal.Biochem.*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982

GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B., Jr.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania* major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J.Immunol.*, v. 144, n. 1, p. 278-283, 1990a

GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. *Leishmania* major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.*, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, 1990b

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.*, v. 10, n. 1, p. 100-111, 2008

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic.Biol.Med.*, v. 12, n. 1, p. 93-95, 1992

HALLIWELL, B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem.Sci.*, v. 31, n. 9, p. 509-515, 2006

HAMPTON, M. B.; VISSERS, M. C.; KEENAN, J. I.; WINTERBOURN, C. C. Oxidant-mediated phosphatidylserine exposure and macrophage uptake of activated neutrophils: possible impairment in chronic granulomatous disease. *J.Leukoc.Biol.*, v. 71, n. 5, p. 775-781, 2002

HATANAKA, E.; CARVALHO, B. T.; CONDINO-NETO, A.; CAMPA, A. Hyperresponsiveness of neutrophils from gp 91phox deficient patients to lipopolysaccharide and serum amyloid A. *Immunol.Lett.*, v. 94, n. 1-2, p. 43-46, 2004

HATTORI, H.; SUBRAMANIAN, K. K.; SAKAI, J.; LUO, H. R. Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis. *Commun.Integr.Biol.*, v. 3, n. 3, p. 278-281, 2010

HENARD, C. A.; CARLSEN, E. D.; HAY, C.; KIMA, P. E.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis* amastigotes highly express a trypanothione peroxidase isoform that increases parasite resistance to macrophage antimicrobial defenses and Fosters parasite virulence. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 8, n. 7, p. e3000-2014

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. *Lancet*, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999

HEYWORTH, P. G.; CROSS, A. R.; CURNUTTE, J. T. Chronic granulomatous disease. *Curr.Opin.Immunol.*, v. 15, n. 5, p. 578-584, 2003

HIRAOKA, W.; VAZQUEZ, N.; NIEVES-NEIRA, W.; CHANOCK, S. J.; POMMIER, Y. Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J.Clin.Invest*, v. 102, n. 11, p. 1961-1968, 1998

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONCALVES, R.; LEMESRE, J. L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology*, v. 132 Suppl, n. S19-S32, 2006

HOLZMULLER, P.; SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; MANGOT, I.; DAULOUEDE, S.; VINCENTEAU, P.; LEMESRE, J. L. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infect.Immun.*, v. 70, n. 7, p. 3727-3735, 2002

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. *J.Infect.*, v. 39, n. 2, p. 101-111, 1999

HORTA, M. F.; MENDES, B. P.; ROMA, E. H.; NORONHA, F. S.; MACEDO, J. P.; OLIVEIRA, L. S.; DUARTE, M. M.; VIEIRA, L. Q. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J.Parasitol.Res.*, v. 2012, n. 203818-2012

JACOBSON, N. G.; SZABO, S. J.; WEBER-NORDT, R. M.; ZHONG, Z.; SCHREIBER, R. D.; DARNELL, J. E., Jr.; MURPHY, K. M. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J.Exp.Med.*, v. 181, n. 5, p. 1755-1762, 1995

KAPLAN, M. H.; SUN, Y. L.; HOEY, T.; GRUSBY, M. J. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, v. 382, n. 6587, p. 174-177, 1996a

KAPLAN, M. H.; SCHINDLER, U.; SMILEY, S. T.; GRUSBY, M. J. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, v. 4, n. 3, p. 313-319, 1996b

KASAHARA, Y.; IWAI, K.; YACHIE, A.; OHTA, K.; KONNO, A.; SEKI, H.; MIYAWAKI, T.; TANIGUCHI, N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood*, v. 89, n. 5, p. 1748-1753, 1997a

KASAHARA, Y.; IWAI, K.; YACHIE, A.; OHTA, K.; KONNO, A.; SEKI, H.; MIYAWAKI, T.; TANIGUCHI, N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood*, v. 89, n. 5, p. 1748-1753, 1997b

KAUR, S.; KAUR, T.; GARG, N.; MUKHERJEE, S.; RAINA, P.; ATHOKPAM, V. Effect of dose and route of inoculation on the generation of CD4+ Th1/Th2 type of immune response in murine visceral leishmaniasis. *Parasitol.Res.*, v. 103, n. 6, p. 1413-1419, 2008a

KAUR, S.; KAUR, T.; GARG, N.; MUKHERJEE, S.; RAINA, P.; ATHOKPAM, V. Effect of dose and route of inoculation on the generation of CD4+ Th1/Th2 type of immune response in murine visceral leishmaniasis. *Parasitol.Res.*, v. 103, n. 6, p. 1413-1419, 2008b

KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology*, v. 136, n. 10, p. 1193-1199, 2009

KAYE, P. M.; CURRY, A. J.; BLACKWELL, J. M. Differential production of Th1- and Th2-derived cytokines does not determine the genetically controlled or vaccine-induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 146, n. 8, p. 2763-2770, 1991

KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitology*, v. 133 Suppl, n. S87-112, 2006

KHOURI, R.; BAFICA, A.; SILVA, Mda P.; NORONHA, A.; KOLB, J. P.; WIETZERBIN, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; VAN, Weyenbergh J. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 182, n. 4, p. 2525-2531, 2009

KIMBLIN, N.; PETERS, N.; DEBRABANT, A.; SECUNDINO, N.; EGEN, J.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; KAMHAWI, S.; SACKS, D. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 105, n. 29, p. 10125-10130, 2008

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann.Intern.Med.*, v. 93, n. 3, p. 480-489, 1980

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. An apoptosis differentiation programme in human polymorphonuclear leucocytes. *Biochem.Soc.Trans.*, v. 32, n. Pt3, p. 474-476, 2004

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

LANGERMANS, J. A.; VAN DER HULST, M. E.; NIBBERING, P. H.; HIEMSTRA, P. S.; FRANSEN, L.; VAN, Furth R. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.*, v. 148, n. 2, p. 568-574, 1992

LAROUX, F. S.; ROMERO, X.; WETZLER, L.; ENGEL, P.; TERHORST, C. Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria. *J.Immunol.*, v. 175, n. 9, p. 5596-5600, 2005

LAWRENCE, M. B.; SPRINGER, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, v. 65, n. 5, p. 859-873, 1991

LECOEUR, H.; LEDRU, E.; PREVOST, M. C.; GOUGEON, M. L. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J.Immunol.Methods*, v. 209, n. 2, p. 111-123, 1997

LEKSTROM-HIMES, J. A.; KUHNS, D. B.; ALVORD, W. G.; GALLIN, J. I. Inhibition of human neutrophil IL-8 production by hydrogen peroxide and dysregulation in chronic granulomatous disease. *J.Immunol.*, v. 174, n. 1, p. 411-417, 2005

LEON, B.; LOPEZ-BRAVO, M.; ARDAVIN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity.*, v. 26, n. 4, p. 519-531, 2007

LETO, T. L.; ADAMS, A. G.; DE, Mendez, I. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 91, n. 22, p. 10650-10654, 1994

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J.Immunol.*, v. 144, n. 12, p. 4794-4797, 1990

LIMA, G. M.; VALLOCHI, A. L.; SILVA, U. R.; BEVILACQUA, E. M.; KIFFER, M. M.; ABRAHAMSOHN, I. A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol.Lett.*, v. 64, n. 2-3, p. 145-151, 1998

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R. A.; SANTOS, C. X.; YAMADA, A. T.; AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radic.Biol.Med.*, v. 30, n. 11, p. 1234-1242, 2001

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. *Eur.J.Immunol.*, v. 36, n. 10, p. 2735-2744, 2006

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

LUMSDEN, W. H. Letter: Biochemical taxonomy of *Leishmania*. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, v. 68, n. 1, p. 74-75, 1974

MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H.; KHALILI, G.; ABRISHAMI, F.; NAJAFY, A.; KHAZE, V. The route of *Leishmania tropica* infection determines disease outcome and protection against *Leishmania major* in BALB/c mice. *Korean J.Parasitol.*, v. 51, n. 1, p. 69-74, 2013

MARRIOTT, H. M.; JACKSON, L. E.; WILKINSON, T. S.; SIMPSON, A. J.; MITCHELL, T. J.; BUTTLE, D. J.; CROSS, S. S.; INCE, P. G.; HELLEWELL, P. G.; WHYTE, M. K.; DOCKRELL, D. H. Reactive oxygen species regulate neutrophil recruitment and survival in pneumococcal pneumonia. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, v. 177, n. 8, p. 887-895, 2008

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, v. 16, n. 188-189, 2000

MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J.Immunol.*, v. 166, n. 3, p. 1912-1920, 2001a

MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J.Immunol.*, v. 166, n. 3, p. 1912-1920, 2001b

MILLER, M. A.; MCGOWAN, S. E.; GANTT, K. R.; CHAMPION, M.; NOVICK, S. L.; ANDERSEN, K. A.; BACCHI, C. J.; YARLETT, N.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*. *J.Biol.Chem.*, v. 275, n. 43, p. 33883-33889, 2000

MIRALLES, G. D.; STOECKLE, M. Y.; MCDERMOTT, D. F.; FINKELMAN, F. D.; MURRAY, H. W. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect.Immun.*, v. 62, n. 3, p. 1058-1063, 1994

MIZRAHI, A.; BERDICHEVSKY, Y.; UGOLEV, Y.; MOLSHANSKI-MOR, S.; NAKASH, Y.; DAHAN, I.; ALLOUL, N.; GORZALCZANY, Y.; SARFSTEIN, R.; HIRSHBERG, M.; PICK, E. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. *J.Leukoc.Biol.*, v. 79, n. 5, p. 881-895, 2006

MODOLELL, M.; CHOI, B. S.; RYAN, R. O.; HANCOCK, M.; TITUS, R. G.; ABEBE, T.; HAILU, A.; MULLER, I.; ROGERS, M. E.; BANGHAM, C. R.; MUNDER, M.; KROPF, P. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 3, n. 7, p. e480-2009

MUKBEL, R. M.; PATTEN, C., Jr.; GIBSON, K.; GHOSH, M.; PETERSEN, C.; JONES, D. E. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 76, n. 4, p. 669-675, 2007

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, v. 95, n. 10, p. 3032-3043, 2000

MURPHY, P. M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I. F.; HEBERT, C. A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H.; OPPENHEIM, J. J.; POWER, C. A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol.Rev.*, v. 52, n. 1, p. 145-176, 2000

MURRAY, H. W. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J.Immunol.*, v. 129, n. 1, p. 351-357, 1982

MURRAY, H. W.; HARIPRASHAD, J. Interleukin 12 is effective treatment for an established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. *J.Exp.Med.*, v. 181, n. 1, p. 387-391, 1995

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J.Exp.Med.*, v. 189, n. 4, p. 741-746, 1999

MURRAY, H. W.; RUBIN, B. Y.; ROTHERMEL, C. D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J.Clin.Invest*, v. 72, n. 4, p. 1506-1510, 1983

MURRAY, H. W.; MIRALLES, G. D.; STOECKLE, M. Y.; MCDERMOTT, D. F. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 151, n. 2, p. 929-938, 1993

MURRAY, H. W.; JUNGBLUTH, A.; RITTER, E.; MONTELIBANO, C.; MARINO, M. W. Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. *Infect.Immun.*, v. 68, n. 11, p. 6289-6293, 2000

MURRAY, H. W.; STERN, J. J.; WELTE, K.; RUBIN, B. Y.; CARRIERO, S. M.; NATHAN, C. F. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma. *J.Immunol.*, v. 138, n. 7, p. 2290-2297, 1987

MURRAY, H. W.; LU, C. M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A. L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R. L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect.Immun.*, v. 70, n. 11, p. 6284-6293, 2002

NABORS, G. S.; NOLAN, T.; CROOP, W.; LI, J.; FARRELL, J. P. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunol.*, v. 17, n. 11, p. 569-579, 1995

NAUSEEF, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol.Rev.*, v. 219, n. 88-102, 2007

NIEVES, E.; PIMENTA, P. F. Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v. 67, n. 6, p. 640-647, 2002

OGIER-DENIS, E.; MKADDEM, S. B.; VANDEWALLE, A. NOX enzymes and Toll-like receptor signaling. *Semin.Immunopathol.*, v. 30, n. 3, p. 291-300, 2008

OLIVEIRA, D. M.; COSTA, M. A.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; GOMES, R. F.; MELO, M. N.; SOTO, M.; TAVARES, C. A.; COELHO, E. A. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol.Res.*, v. 110, n. 3, p. 1277-1285, 2012a

OLIVEIRA, D. M.; COSTA, M. A.; CHAVEZ-FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; COSTA, L. E.; MARTINS, V. T.; GOMES, R. F.; MELO, M. N.; SOTO, M.; TAVARES, C. A.; COELHO, E. A. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol.Res.*, v. 110, n. 3, p. 1277-1285, 2012b

OLIVIER, M.; BROWNSEY, R. W.; REINER, N. E. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 89, n. 16, p. 7481-7485, 1992

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin.Microbiol.Rev.*, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005

OMS. http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_en.pdf, v. WHO, Geneva, Switzerland, n. 2002

OMS. The global burden of disease: 2004 update. v. 2004

OSORIO, Y.; MELBY, P. C.; PIRMEZ, C.; CHANDRASEKAR, B.; GUARIN, N.; TRAVI, B. L. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunol.*, v. 25, n. 3, p. 139-148, 2003

OTTONELLO, L.; FRUMENTO, G.; ARDUINO, N.; BERTOLOTTO, M.; DAPINO, P.; MANCINI, M.; DALLEGRI, F. Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase-3. *J.Leukoc.Biol.*, v. 72, n. 1, p. 125-132, 2002

PAWATE, S.; SHEN, Q.; FAN, F.; BHAT, N. R. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferongamma. *J.Neurosci.Res.*, v. 77, n. 4, p. 540-551, 2004

PEREIRA, B. A.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet.Parasitol.*, v. 158, n. 4, p. 239-255, 2008

PEREIRA, W. F.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; GUILLERMO, L. V.; VELLOZO, N. S.; MONTALVAO, F.; DOSREIS, G. A.; LOPES, M. F. Myeloid-derived suppressor cells help protective immunity to *Leishmania* major infection despite suppressed T cell responses. *J.Leukoc.Biol.*, v. 90, n. 6, p. 1191-1197, 2011

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

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008

PIERCE, G. B.; PARCHMENT, R. E.; LEWELLYN, A. L. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. *Differentiation*, v. 46, n. 3, p. 181-186, 1991

PIMENTA, P. F.; TURCO, S. J.; MCCONVILLE, M. J.; LAWYER, P. G.; PERKINS, P. V.; SACKS, D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, v. 256, n. 5065, p. 1812-1815, 1992

PRATT, D. M.; DAVID, J. R. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature*, v. 291, n. 5816, p. 581-583, 1981

PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C. A.; LIEW, F. Y. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania* major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur.J.Immunol.*, v. 25, n. 3, p. 745-750, 1995

PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A. V.; FENG, G. J.; WEI, W. Q.; FERGUSON, M. A.; BRIMACOMBE, J. S.; LIEW, F. Y. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 93, n. 20, p. 10984-10989, 1996

PURUSHOTHAMAN, D.; SARIN, A. Cytokine-dependent regulation of NADPH oxidase activity and the consequences for activated T cell homeostasis. *J.Exp.Med.*, v. 206, n. 7, p. 1515-1523, 2009

RABINOVITCH, M. The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages. *Exp.Cell Res.*, v. 46, n. 1, p. 19-28, 1967

RADA, B.; LETO, T. L. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib.Microbiol.*, v. 15, n. 164-187, 2008

RADA, B. K.; GEISZT, M.; VAN, Bruggen R.; NEMET, K.; ROOS, D.; LIGETI, E. Calcium signalling is altered in myeloid cells with a deficiency in NADPH oxidase activity. *Clin.Exp.Immunol.*, v. 132, n. 1, p. 53-60, 2003

REPINE, J. E.; FOX, R. B.; BERGER, E. M. Hydrogen peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. *J.Biol.Chem.*, v. 256, n. 14, p. 7094-7096, 1981

REQUENA, J. M.; SOTO, M.; DORIA, M. D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet.Immunol.Immunopathol.*, v. 76, n. 3-4, p. 269-281, 2000

RIBEIRO-GOMES, F. L.; PETERS, N. C.; DEBRABANT, A.; SACKS, D. L. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS.Pathog.*, v. 8, n. 2, p. e1002536-2012

RIBEIRO-GOMES, F. L.; ROMA, E. H.; CARNEIRO, M. B.; DORIA, N. A.; SACKS, D. L.; PETERS, N. C. Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*. *Infect.Immun.*, v. 82, n. 7, p. 2713-2727, 2014

RICHTER, Y.; GROOTHUIS, A.; SEIFERT, P.; EDELMAN, E. R. Dynamic flow alterations dictate leukocyte adhesion and response to endovascular interventions. *J.Clin.Invest.*, v. 113, n. 11, p. 1607-1614, 2004

RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann.Parasitol.Hum.Comp.*, v. 65, n. 3, p. 111-125, 1990

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS.Pathog.*, v. 3, n. 6, p. e91-2007

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, v. 124, n. Pt 5, p. 495-507, 2002

RUSSELL, D. G.; TALAMAS-ROHANA, P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol.Today*, v. 10, n. 10, p. 328-333, 1989

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp.Parasitol.*, v. 69, n. 1, p. 100-103, 1989

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, 1984

SAHA, B.; BASAK, S. K.; ROY, S. Immunobiological studies on experimental visceral leishmaniasis. III. Cytokine-mediated regulation of parasite replication. *Scand.J.Immunol.*, v. 37, n. 2, p. 155-158, 1993

SALAM, N.; AL-SHAQHA, W. M.; AZZI, A. Leishmaniasis in the middle East: incidence and epidemiology. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 8, n. 10, p. e3208-2014

SANMUN, D.; WITASP, E.; JITKAEW, S.; TYURINA, Y. Y.; KAGAN, V. E.; AHLIN, A.; PALMBLAD, J.; FADEEL, B. Involvement of a functional NADPH oxidase in neutrophils and macrophages during programmed cell clearance: implications for chronic granulomatous disease. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, v. 297, n. 3, p. C621-C631, 2009

SARTORI, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; COE, J.; CAMPOS-NETO, A. Immune complex glomerulonephritis in experimental kala-azar. II: Detection and characterization of parasite antigens and antibodies eluted from kidneys of *Leishmania donovani*-infected hamsters. *Clin.Exp.Immunol.*, v. 87, n. 3, p. 386-392, 1992

SCANDALIOS, J. G. The rise of ROS. *Trends Biochem.Sci.*, v. 27, n. 9, p. 483-486, 2002

SCHAPPI, M.; DEFFERT, C.; FIETTE, L.; GAVAZZI, G.; HERRMANN, F.; BELL, D.; KRAUSE, K. H. Branched fungal beta-glucan causes hyperinflammation and necrosis in phagocyte NADPH oxidase-deficient mice. *J.Pathol.*, v. 214, n. 4, p. 434-444, 2008

SCHEEL-TOELLNER, D.; WANG, K.; CRADDOCK, R.; WEBB, P. R.; MCGETTRICK, H. M.; ASSI, L. K.; PARKES, N.; CLOUGH, L. E.; GULBINS, E.; SALMON, M.; LORD,

J. M. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood*, v. 104, n. 8, p. 2557-2564, 2004

SCHMIDT, K. N.; AMSTAD, P.; CERUTTI, P.; BAEUERLE, P. A. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem.Biol.*, v. 2, n. 1, p. 13-22, 1995

SCHRECK, R.; BAEUERLE, P. A. A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol.*, v. 1, n. 2-3, p. 39-42, 1991

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

SHATWELL, K. P.; SEGAL, A. W. NADPH oxidase. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, v. 28, n. 11, p. 1191-1195, 1996

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004

SMELT, S. C.; COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J.Immunol.*, v. 164, n. 7, p. 3681-3688, 2000

SORENSEN, A. L.; HEY, A. S.; KHARAZMI, A. *Leishmania* major surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS*, v. 102, n. 4, p. 265-271, 1994

SOUSA-FRANCO, J.; ARAUJO-MENDES, E.; SILVA-JARDIM, I.; SANTOS, J.; FARIA, D. R.; DUTRA, W. O.; HORTA, M. F. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. *Microbes.Infect.*, v. 8, n. 2, p. 390-400, 2006

SOUTO-PADRON, T. The surface charge of trypanosomatids. *An.Acad.Bras.Cienc.*, v. 74, n. 4, p. 649-675, 2002

SPINNER, J. L.; SEO, K. S.; O'LOUGHLIN, J. L.; CUNDIFF, J. A.; MINNICH, S. A.; BOHACH, G. A.; KOBAYASHI, S. D. Neutrophils are resistant to *Yersinia* YopJ/P-

induced apoptosis and are protected from ROS-mediated cell death by the type III secretion system. *PLoS.One.*, v. 5, n. 2, p. e9279-2010

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol.Cell Biol.*, v. 85, n. 2, p. 138-147, 2007

STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity.*, v. 22, n. 5, p. 539-550, 2005

SZABO, S. J.; KIM, S. T.; COSTA, G. L.; ZHANG, X.; FATHMAN, C. G.; GLIMCHER, L. H. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, v. 100, n. 6, p. 655-669, 2000

TABBARA, K. S.; PETERS, N. C.; AFRIN, F.; MENDEZ, S.; BERTHOLET, S.; BELKAID, Y.; SACKS, D. L. Conditions influencing the efficacy of vaccination with live organisms against *Leishmania major* infection. *Infect.Immun.*, v. 73, n. 8, p. 4714-4722, 2005

TACCHINI-COTTIER, F.; ZWEIFEL, C.; BELKAID, Y.; MUKANKUNDIYE, C.; VASEI, M.; LAUNOIS, P.; MILON, G.; LOUIS, J. A. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J.Immunol.*, v. 165, n. 5, p. 2628-2636, 2000

THALHOFER, C. J.; CHEN, Y.; SUDAN, B.; LOVE-HOMAN, L.; WILSON, M. E. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infect.Immun.*, v. 79, n. 1, p. 108-117, 2011

VAN DE LOO, F. A.; BENNINK, M. B.; ARNTZ, O. J.; SMEETS, R. L.; LUBBERTS, E.; JOOSTEN, L. A.; VAN LENT, P. L.; COENEN-DE ROO, C. J.; CUZZOCREA, S.; SEGAL, B. H.; HOLLAND, S. M.; VAN DEN BERG, W. B. Deficiency of NADPH oxidase components p47phox and gp91phox caused granulomatous synovitis and increased connective tissue destruction in experimental arthritis models. *Am.J.Pathol.*, v. 163, n. 4, p. 1525-1537, 2003

VAN, Assche T.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R. A.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic.Biol.Med.*, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect.Immun.*, v. 62, n. 11, p. 5177-5182, 1994

VON, Gunten S.; YOUSEFI, S.; SEITZ, M.; JAKOB, S. M.; SCHAFFNER, T.; SEGER, R.; TAKALA, J.; VILLIGER, P. M.; SIMON, H. U. Siglec-9 transduces apoptotic and nonapoptotic death signals into neutrophils depending on the proinflammatory cytokine environment. *Blood*, v. 106, n. 4, p. 1423-1431, 2005

WALLACH, D.; VARFOLOMEEV, E. E.; MALININ, N. L.; GOLTSEV, Y. V.; KOVALENKO, A. V.; BOLDIN, M. P. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu.Rev.Immunol.*, v. 17, n. 331-367, 1999

WEI, X. Q.; CHARLES, I. G.; SMITH, A.; URE, J.; FENG, G. J.; HUANG, F. P.; XU, D.; MULLER, W.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, v. 375, n. 6530, p. 408-411, 1995

WILSON, M. E.; YOUNG, B. M.; DAVIDSON, B. L.; MENTE, K. A.; MCGOWAN, S. E. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 161, n. 11, p. 6148-6155, 1998

WILSON, M. E.; SANDOR, M.; BLUM, A. M.; YOUNG, B. M.; METWALI, A.; ELLIOTT, D.; LYNCH, R. G.; WEINSTOCK, J. V. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *J.Immunol.*, v. 156, n. 6, p. 2231-2239, 1996

WILSON, R.; BATES, M. D.; DOSTALOVA, A.; JECNA, L.; DILLON, R. J.; VOLF, P.; BATES, P. A. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 4, n. 9, p. 2010

WINTERBOURN, C. C. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology*, v. 181-182, n. 223-227, 2002

YAMAMOTO, A.; TANIUCHI, S.; TSUJI, S.; HASUI, M.; KOBAYASHI, Y. Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed *Staphylococcus aureus*. *Clin.Exp.Immunol.*, v. 129, n. 3, p. 479-484, 2002

YANG, D. M.; FAIRWEATHER, N.; BUTTON, L. L.; MCMASTER, W. R.; KAHL, L. P.; LIEW, F. Y. Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J.Immunol.*, v. 145, n. 7, p. 2281-2285, 1990

ZARBOCK, A.; LEY, K. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation.*, v. 16, n. 1, p. 31-42, 2009

ZARLEY, J. H.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani* chagasi promastigotes. Role of hydroxyl radical and protection by heat shock. *J.Clin.Invest*, v. 88, n. 5, p. 1511-1521, 1991

ZHANG, B.; HIRAHASHI, J.; CULLERE, X.; MAYADAS, T. N. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. *J.Biol.Chem.*, v. 278, n. 31, p. 28443-28454, 2003

ZHENG, W.; FLAVELL, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, v. 89, n. 4, p. 587-596, 1997

ZIELONKA, J.; SIKORA, A.; HARDY, M.; JOSEPH, J.; DRANKA, B. P.; KALYANARAMAN, B. Boronate probes as diagnostic tools for real time monitoring of peroxynitrite and hydroperoxides. *Chem.Res.Toxicol.*, v. 25, n. 9, p. 1793-1799, 2012