

MYRIAN MORATO DUARTE

Produção diferencial de óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio por neutrófilos de camundongos susceptíveis e resistentes à infecção por *Leishmania major*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

**Orientadora: Dra. Fátima Soares Motta Noronha
Co-orientadora: Dra. Maria de Fátima Martins Horta
(Departamento de Bioquímica e Imunologia)**

**Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares
Departamento de Microbiologia
Belo Horizonte - 2008**



“Quando Thomas Brock isolou *Sulpholobus*, o dogma científico sustentava que nada podia viver a mais de 50°C, o que é talvez a razão por que ninguém havia pensado em procurar vida num ambiente tão extremo antes. A chave do sucesso de Brock foi que ele cultivou as bactérias que colheu numa temperatura tão alta quanto aquela em que viviam normalmente. Um cientista menos astuto poderia ficar tentado a experimentar uma temperatura mais baixa, na crença equivocada de que as bactérias iriam crescer melhor. Não teriam encontrado nada, pois *Sulpholobus* é um termófilo obrigatório. O isolamento do primeiro extremófilo, como quase toda inovação científica, exigiu uma combinação de observação acurada e uma disposição de levar em conta o que era considerado herético. A memorável afirmação da Rainha Branca em *Através do Espelho* de que ela ‘por vezes acreditava em até seis coisas impossíveis antes do café da manhã’ não é um mau conselho para os cientistas.”

Ashcroft, Frances. A vida no limite - A ciência da sobrevivência. Jorge Zahar Editor, Rio de Janeiro, 2001.

Thomas Edison fez duas mil experiências para conseguir inventar a lâmpada. Um jovem repórter perguntou o que ele achava de tantos fracassos. Edison respondeu: "Não fracassei nenhuma vez. Inventei a lâmpada. Acontece que foi um processo de 2.000 passos."

Este estudo teve o apoio do CNPq, FAPEMIG e Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq).

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo à minha orientadora, Fátima, pela linha deste trabalho e pelas inúmeras colaborações ao longo da pesquisa;

À minha co-orientadora, Patiu, por todas as sugestões e por ceder tão gentilmente o Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitas para tantos experimentos;

Aos colegas do LabMic, pois amigos são imprescindíveis... a convivência tranquila ajudou mais que qualquer outra coisa a suportar os experimentos que dão errado, e recuperar as forças quando dão certo! Agradecimento especial ao "meu" Rafael, uma pessoa que valeu a pena conhecer e conviver... e que espero que continue a mandar notícias sempre! Ao Mateus, que só veio confirmar que eu tenho muita sorte com meus estudantes! À Priscila, que tenha sempre este espírito bom, que conquistou facilmente a minha amizade! À Gio, que reencontrei em tão boa hora... E a todos os outros, tantos que é difícil citar um por um, pelo companheirismo de sempre!

À Jane, que apareceu para dar novo ânimo e um impulso a mais nos experimentos!

À Dani, do laboratório da Walderez... puxa, como agradecer?? Nada que eu escreva expressaria corretamente o quanto ela me ajudou, assim só posso desejar tudo de bom para essa minha grande amiga e, claro, para a Isabela, o bebê mais paparicado do mundo...

À Fernanda, também do laboratório da Wal... aliás todo mundo desse laboratório que eu tanto frequentei nos últimos experimentos... Obrigada Wal!

À Fabi, do Laboratório do Marcão (Fisiologia), pela paciência (maior que a minha) com meus infundáveis *Westerns*...

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Imunologia das Doenças Parasitárias, em especial ao Fabiano e ao João pela paciência em ajudar... e a todos pela ótima convivência!

À Leda e aos colegas do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, gentis e solícitos até nos dias de jogo do Brasil na Copa!...

Ao meu marido Fábio pela compreensão, e aos meus queridos filhos por terem suportado tão bem os muitos momentos de ausência devido à tese...

Ao Greg por ceder os anticorpos marcados para o confocal,

A todas as pessoas que cederam os microscópios, estufas, reagentes, paciência, explicações e demais auxílios, sem os quais esta tese não teria chance de existir...

A todas as pessoas que, de um modo ou de outro, me ajudaram nessa tarefa (e são tantas que não haveria espaço para agradecer a cada uma do modo que merece!), o meu muuuuuuuuito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	ix
Lista de Figuras e Tabelas	xi
Resumo	xiv
Abstract	xv
Introdução	1
Leishmanioses	1
Os modelos de resistência e susceptibilidade em camundongos	2
Neutrófilos	4
Óxido nítrico (NO)	4
Intermediários reativos do oxigênio (IRO)	5
O papel de neutrófilos na infecção por <i>Leishmania</i> spp.	7
O papel dos radicais tóxicos na leishmaniose	10
Justificativa	13
Objetivo Geral	14
Objetivos Específicos	15
Material e Métodos	16
Camundongos	16
<i>Leishmania major</i>	16
Manutenção de <i>Leishmania major</i> em camundongos	17
Congelamento dos parasitas	17
Manutenção das culturas axênicas de <i>Leishmania major</i>	17
Separação de granulócitos da cavidade peritoneal de camundongos	18

Determinação da produção de óxido nítrico	19
Coloração de Griess	19
Detecção da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS)	20
Estímulo dos neutrófilos para a expressão de iNOS	20
Dosagem de proteínas	20
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS	20
<i>Western blot</i> para iNOS	21
Determinação da explosão respiratória	22
Citometria de fluxo	23
Detecção dos componentes da enzima NADPH oxidase	23
Estímulo dos neutrófilos para detecção das proteínas	23
Microscopia confocal	23
Análise estatística	25
Resultados	26
Viabilidade dos neutrófilos em cultivo	26
Produção de óxido nítrico por neutrófilos murinos	26
Produção de NO por neutrófilos peritoneais murinos após interação com promastigotas de <i>L. major</i>	30
Expressão de iNOS em neutrófilos murinos	32
Explosão respiratória	37
Explosão respiratória na presença de <i>L. major</i>	39
Avaliação da expressão e mobilização de proteínas componentes da NADPH oxidase em neutrófilos de camundongos BALB/c e C57BL/6	41
Avaliação do antígeno 7/4 como marcador de neutrófilos de camundongos BALB/c e C57BL/6	41
Expressão e mobilização da proteína p40 <i>phox</i>	43

Expressão e mobilização da proteína p47 <i>phox</i>	45
Avaliação da expressão e mobilização de proteínas componentes da NADPH oxidase na presença de <i>L. major</i>	48
Expressão e mobilização da proteína p40 <i>phox</i> na presença de <i>L. major</i>	48
Expressão e mobilização da proteína p47 <i>phox</i> na presença de <i>L. major</i>	48
Discussão	55
Conclusões	66
Referências Bibliográficas	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA	albumina sérica bovina, <i>bovine serum albumin</i>
CEMEL	Centro de Microscopia Eletrônica
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFSE	<i>carboxy-fluorescein succinimidyl ester</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína
fMLP	<i>formyl-met-leu-phe</i> , formil-metionina-leucina-fenilalanina
GIPLs	fosfolípidos de glicoinositol
gp	glicoproteína
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IFN- γ	interferon gama
IL	interleucina
iNOS	isoforma induzível da óxido nítrico sintase
IRO	intermediários reativos do oxigênio
KC	<i>keratinocyte-derived chemokine</i>
L-NMMA	N-monometil-L-arginina
LPG	lipofosfoglicano
LPS	lipopolissacarídeo
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>

NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NEED	<i>N-naftil-ethylendiamine</i>
NEM	<i>N-ethyl-maleimide</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK	células <i>natural killer</i>
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	radical superóxido
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	salina tamponada com fosfato, <i>phosphate buffered saline</i>
PKC	proteína-quinase-C
PMA	<i>phorbol-myristate-acetate</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	sódio-dodecil-sulfato
SFBi	soro fetal bovino inativado
TGF-β	fator de crescimento transformante-beta
Th1	células T auxiliares do tipo 1
Th2	células T auxiliares do tipo 2
TNF-α	fator de necrose tumoral-alfa
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Esquema representativo do mecanismo de ativação da óxido nítrico sintase indutível e da biossíntese de óxido nítrico	6
Figura 2. Esquema representativo da ativação da NADPH oxidase	8
Figura 3. Viabilidade de neutrófilos peritoneais murinos durante cultivo in vitro	27
Figura 4. Produção de NO por neutrófilos murinos após estímulo com IFN- γ	28
Figura 5. Produção de NO por neutrófilos murinos em diversas concentrações de LPS e IFN- γ	29
Figura 6. Inibição da produção de NO em neutrófilos murinos por promastigotas de <i>L. major</i>	31
Figura 7. Inibição da produção de NO em neutrófilos murinos por <i>L. major</i> vivas ou mortas pelo calor na presença de 50 ng/mL de LPS e 50 UI/mL de IFN- γ	33
Figura 8. Expressão de iNOS em neutrófilos murinos na presença de LPS e IFN- γ .	35
Figura 9. Expressão de iNOS induzida por LPS e IFN- γ em neutrófilos de BALB/c e C57BL/6 na presença de promastigotas de <i>L. major</i>	36
Figura 10. Explosão respiratória induzida por PMA em neutrófilos murinos na presença de LPS e IFN- γ	38
Figura 11. Explosão respiratória induzida por PMA em neutrófilos murinos previamente estimulados com LPS e IFN- γ	39
Figura 12. Explosão respiratória induzida por PMA em neutrófilos murinos na presença de <i>L. major</i>	40
Figura 13. Gráfico de distribuição puntual para análise da marcação de neutrófilos murinos pelo anticorpo RM6501, contra o antígeno 7/4 de células polimorfonucleares	42
Figura 14. Microscopia confocal para análise de marcação de neutrófilos murinos pelo anticorpo RM6501, contra o antígeno 7/4 de células polimorfonucleares	42

Figura 15. Detecção de p40 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na ausência de PMA	43
Figura 16. Detecção de p40 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na ausência de PMA	44
Figura 17. Detecção de p40 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na presença de PMA	44
Figura 18. Detecção de p40 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na presença de PMA	45
Figura 19. Detecção de p47 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na ausência de PMA	46
Figura 20. Detecção de p47 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na ausência de PMA	46
Figura 21. Detecção de p47 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na presença de PMA	47
Figura 22. Detecção de p47 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na presença de PMA	47
Figura 23. Mobilização de p40 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na ausência de PMA e na presença de <i>L. major</i>	49
Figura 24. Mobilização de p40 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na ausência de PMA e na presença de <i>L. major</i>	49
Figura 25. Mobilização de p40 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na presença de PMA e de <i>L. major</i>	50
Figura 26. Mobilização de p40 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na presença de PMA e de <i>L. major</i>	51
Figura 27. Mobilização de p47 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na ausência de PMA e na presença de <i>L. major</i>	52
Figura 28. Mobilização de p47 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na ausência de PMA e na presença de <i>L. major</i>	52

Figura 29. Mobilização de p47 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na presença de PMA e de <i>L. major</i>	53
Figura 30. Mobilização de p47 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na presença de PMA e de <i>L. major</i>	53
Tabela 1. Porcentagem de células positivas para p40 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 na presença e na ausência de PMA e/ou <i>L. major</i>	51
Tabela 2. Porcentagem de células positivas para p47 <i>phox</i> em neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 na presença e na ausência de PMA e/ou <i>L. major</i>	54

RESUMO

Neste trabalho, estudamos a interação entre promastigotas de *Leishmania major* e neutrófilos de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, utilizados como protótipos de susceptibilidade e resistência à infecção por este parasita. Demonstramos diferenças intrínsecas entre as duas linhagens na produção de óxido nítrico, que se refletiram na expressão da enzima responsável, a óxido nítrico sintase indutível (iNOS). Neutrófilos obtidos de camundongos C57BL/6 produzem mais óxido nítrico em resposta ao estímulo de IFN- γ e LPS em relação à linhagem BALB/c. Promastigotas de *L. major* foram capazes de inibir a produção de NO e a expressão da enzima em ambas as linhagens de camundongo. Demonstramos ainda que a produção de radicais de oxigênio, outro mecanismo microbicida de neutrófilos, também é diferenciada nos neutrófilos das duas linhagens de camundongo. Neste caso, a linhagem BALB/c é capaz de produzir uma quantidade maior de radicais de oxigênio em resposta a PMA. A expressão de proteínas p40phox e p47phox se mostrou diferenciada nos neutrófilos das duas linhagens de camundongos. A produção de radicais de oxigênio é influenciada pela interação de promastigotas de *L. major* com a célula.

Palavras-chave: *Leishmania major*, neutrófilos, óxido nítrico, NADPH oxidase

ABSTRACT

In this study we investigated the interaction between *Leishmania major* promastigotes and neutrophils of two mouse strains, BALB/c and C57BL/6, the prototype hosts for susceptibility and resistance to *L. major* infection. We showed intrinsic differences between neutrophils of these two mouse strains in the nitric oxide (NO) production, reflected in nitric oxide synthase (iNOS) expression. C57BL/6 neutrophils produced more NO after IFN- γ and LPS exposure than BALB/c cells. *L. major* promastigotes were able to reduce NO production and iNOS expression, in both mouse strains. We demonstrated that oxygen radicals production, another microbicidal mechanism of neutrophils, differed between cells of the two mouse strains. Neutrophils from BALB/c mouse produced more oxygen radicals than C57BL/6 cells after PMA stimulation. The p40*phox* and p47*phox* expression was distinct in neutrophils from those two strains. The oxygen radicals production is inhibited by interaction with *L. major* promastigotes.

Keywords: *Leishmania major*, neutrophils, nitric oxide, NADPH oxidase

INTRODUÇÃO

Leishmanioses

Os protozoários do gênero *Leishmania* são causadores da leishmaniose, doença que ocorre em todos os continentes exceto Oceania e Antártica. As leishmanias possuem como hospedeiros várias espécies de mamíferos, incluindo seres humanos. São parasitas dimórficos, existindo na forma amastigota, intracelular e imóvel, quando infectando o hospedeiro vertebrado, e na forma móvel e flagelada, chamada de promastigota, no trato digestivo do inseto vetor, os flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* spp. (no Velho Mundo) ou *Lutzomyia* spp. (no Novo Mundo). As fêmeas do inseto vetor se infectam ao se alimentarem do sangue do hospedeiro vertebrado infectado. Após ingerido pelo inseto, o repasto sanguíneo é envolvido pela matriz peritrófica, secretada pelo epitélio da parede intestinal, e neste ambiente os parasitas ainda podem sofrer algumas divisões na fase de amastigotas. Estas formas se diferenciam nas promastigotas procíclicas, que se replicam rapidamente e produzem uma quitinase que digere a matriz peritrófica em desintegração (Pimenta *et al.*, 1997). Ainda ativamente em divisão, as promastigotas se ancoram às paredes do intestino do inseto através do corpo e do flagelo, através do reconhecimento de um receptor para LPG (Pimenta *et al.*, 1992; Kamhawi *et al.*, 2004). Entre 5 a 8 dias, ocorre posterior diferenciação em formas altamente infecciosas que recebem a denominação de promastigotas metacíclicas (Handman, 2001; Sacks, 1989). As formas metacíclicas são mais finas, altamente móveis e com longos flagelos (Handman, 2001).

Ao serem transmitidas para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos e transformam-se, dentro da célula hospedeira, em amastigotas. O curso da doença é altamente dependente tanto da espécie do parasita quanto da resposta imune do hospedeiro (Milon *et al.*, 1995).

Há três formas clínicas principais da doença. A leishmaniose visceral leva a uma doença sistêmica e eventualmente fatal, causada pelas espécies *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi*. A leishmaniose mucocutânea, ou espúndia, caracteriza-se por lesões desfigurantes das mucosas do nariz e boca, e é causada por espécies do subgênero *Viannia*, como *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) panamensis*. A leishmaniose cutânea, que causa úlceras definidas na pele, é causada por espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia*, como *Leishmania major*, *Leishmania*

tropica, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania (V.) guianensis*, entre outras. Uma quarta forma de leishmaniose, a leishmaniose cutânea difusa, pode ser causada por *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) aethiopica* (Singh, 2006).

No Velho Mundo, a leishmaniose cutânea zoonótica é causada por *L. major*, cujos reservatórios se restringem a roedores encontrados em áreas rurais, especialmente o gerbil *Psammomys obesus*. O principal inseto transmissor na região é *Phlebotomus papatasi*. A urbanização e a construção de barragens têm aumentado o número de casos e causado constantes surtos da doença na região (Desjeux, 2001), permanecendo um problema de saúde pública ainda não solucionado especialmente no norte da África e na Ásia. A leishmaniose cutânea nestas regiões ainda causa considerável morbidade. Os sintomas da doença causada por *L. major* são diversos, desde ulcerações auto-limitadas benignas a lesões extensas e desfigurantes. Estudos de campo revelam que ocorrem também infecções assintomáticas nas áreas endêmicas, de forma relativamente frequente, chegando a um terço das infecções (Ben-Salah *et al.*, 2005).

Indivíduos previamente expostos a *L. major*, com quadros assintomáticos ou não, podem adquirir resistência à infecção posterior, mas esta proteção não é absoluta nem dura por toda a vida. Ben-Salah e colaboradores (2005) relatam que a proteção adquirida por infecção natural encontra-se por volta de 70% e é independente das pressões de transmissão da doença. Os métodos atuais para controle da leishmaniose têm conseguido baixa eficácia, pois as drogas leishmanicidas são bastante tóxicas e as vacinas atualmente testadas apresentam baixa proteção. O aparente contraste entre a eficiência da proteção adquirida de uma infecção natural prévia e a conferida pelas vacinas de parasitas mortos mostra a necessidade de estudos sobre as bases imunológicas da resistência a *Leishmania* spp. (Ben-Salah *et al.*, 2005).

Os modelos de resistência e susceptibilidade em camundongos

O inóculo de promastigotas de *Leishmania* spp. em linhagens isogênicas de camundongo resulta em um espectro de respostas que variam da resolução da infecção a uma doença progressiva e fatal, que pode mimetizar a infecção em seres humanos. Estes estudos têm gerado hipóteses que buscam explicar a capacidade do hospedeiro em controlar ou não a disseminação do parasita (Barral *et al.*, 1983; Reiner & Locksley, 1992; Rogers *et al.*, 2002; Laskay *et al.*, 2003).

O modelo mais estudado é o da infecção de camundongos com a espécie *L. major*, que permitiu a identificação de linhagens murinas que apresentam respostas contrastantes (Heinzel *et al.*, 1989). Linhagens como C57BL/6 e C3H/HeN, por exemplo, são capazes de controlar a replicação desse parasita após inóculo tanto de amastigotas quanto de promastigotas, com o desenvolvimento de resistência ao longo das 2 a 4 semanas subsequentes. A resposta imune caracterizada pela proliferação de células TCD4+ que produzem IFN- γ em grande quantidade, ou células T *helper* do tipo 1 (Th1) (Heinzel *et al.*, 1989; Milon *et al.*, 1995; Alexander & Bryson, 2005), levam à eliminação do parasita, principalmente pela produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos estimulados por esta citocina. Linhagens com *background* BALB são tipicamente susceptíveis a *L. major*, sendo a linhagem BALB/c a mais estudada. Nestes camundongos ocorre disseminação do parasita, a partir do sítio de inóculo inicial, para linfonodos, fígado e baço, resultando em uma doença progressiva com hipergamaglobulinemia que se assemelha ao calazar humano. Neste modelo, ocorre expansão de células TCD4+ chamadas Th2 que não produzem IFN- γ em resposta aos antígenos do parasita, mas produzem, além de outras citocinas, a IL-4 e IL-10, que interferem com a ativação de macrófagos por IFN- γ e auxiliam células B na resposta humoral (Heinzel *et al.*, 1989; Milon *et al.*, 1995; Alexander & Bryson, 2005).

Diferentes espécies de *Leishmania*, entretanto, causam diferentes quadros clínicos nas linhagens de camundongo tipicamente resistentes ou susceptíveis a *L. major*. A infecção por *L. amazonensis* produz nestas linhagens inicialmente um quadro semelhante ao causado por *L. major*, entretanto, os camundongos C57BL/6 voltam a apresentar lesão com o decorrer do tempo, podendo apresentar metástases depois de um ano da infecção (Barral *et al.*, 1983). É interessante observar também que embora camundongos C57BL/10 e BALB/c sejam ambos susceptíveis à infecção por *L. amazonensis*, cada linhagem apresenta um quadro clínico e respostas de células Th diferentes (Afonso & Scott, 1993).

Entretanto, para qualquer espécie de *Leishmania*, o estabelecimento da doença se deve à não ativação de uma resposta imune eficaz ou à resistência aos mecanismos microbicidas das células de defesa. A não ativação da resposta imune pode estar relacionada às características intrínsecas tanto do parasita quanto do hospedeiro (Alexander & Bryson, 2005). Em todas as alternativas, o estudo das células de defesa que são recrutadas para o local da infecção pode revelar aspectos fundamentais desta interação.

Neutrófilos

Com a capacidade de destruir patógenos invasores, os neutrófilos são células que circulam em grande quantidade pela corrente sanguínea e reagem imediatamente a sinais de infecção, migrando prontamente em direção à origem do sinal. São os mais numerosos entre as células de defesa conhecidas como granulócitos, que incluem também os eosinófilos e os basófilos. Estas células produzem uma grande variedade de agentes tóxicos, incluindo poderosos oxidantes e enzimas hidrolíticas (English, 1999). Vários destes agentes podem individualmente eliminar patógenos (Segal, 2005). A ativação da resposta de neutrófilos também danifica o tecido adjacente, perpetuando a resposta inflamatória e atraindo mais células de defesa.

Ao encontrar o patógeno invasor, o neutrófilo internaliza-o pelo processo de fagocitose. Várias respostas celulares são disparadas e lisossomos descarregam enzimas hidrolíticas e radicais livres altamente tóxicos, entre outras moléculas, no vacúolo fagocítico. Alguns mediadores como o NO e citocinas são liberados da célula e possuem funções inflamatórias importantes no ambiente extracelular (Witko-Sarsat, 2000).

O evento inicial que resulta na ativação do neutrófilo frequentemente envolve a ligação de um antígeno em um receptor de membrana, que desencadeia a ativação de mediadores intracelulares e leva à geração de segundos mensageiros ou ativação de enzimas. Estes processos são primariamente governados por proteínas-G, proteína-quinases e fosfolipases, entretanto em muitos casos os processos bioquímicos que ligam a transmissão da informação ao evento final não são bem definidos (English, 1999; Witko-Sarsat, 2000, Segal, 2005).

Entre as moléculas microbicidas mais bem estudadas em neutrófilos, que podem ser importantes no processo de desenvolvimento da patologia da leishmaniose, estão o óxido nítrico e os radicais livres de oxigênio.

Óxido nítrico (NO)

Células de defesa ativadas produzem grande variedade de moléculas implicadas na atividade microbicida. Por sua toxicidade, o NO possui papel importante entre estas moléculas antimicrobianas.

Além de sua ação tóxica direta contra agentes invasores, o NO é uma molécula que também age como mediador, vasodilatador e neurotransmissor, possuindo, assim, funções na resposta inflamatória e na resposta imune, a despeito de sua meia-vida de apenas alguns

segundos. A produção de NO resulta da deaminação de L-arginina, resultando em L-citrulina, reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que possui várias isoformas. Uma delas, a óxido nítrico sintase indutível (iNOS), é expressa nas células de defesa após ativação por diversas citocinas ou toxinas (Oswald & James, 1996). O NO é um gás altamente reativo que pode se difundir livremente pelas membranas sem necessidade de um receptor específico. Em solução aquosa, o NO é degradado a nitrito (NO_2^-) e, na presença do grupo heme, também em nitrato (NO_3^-). O esquema representativo destas reações está mostrado na **Figura 1**.

Intermediários reativos do oxigênio (IRO)

A explosão respiratória, ou súbita produção de radicais livres de oxigênio, é parte importante da resposta de fagócitos a uma infecção. O radical superóxido (O_2^-) é produzido pela ação da NADPH oxidase, um citocromo de membrana que transfere um elétron para o oxigênio molecular, em resposta à fagocitose de parasitas, diferentemente da geração de NO que necessita de ativação por citocinas (Gantt *et al.*, 2001). O radical superóxido é dismutado a peróxido de hidrogênio (espontaneamente ou pela enzima superóxido dismutase), utilizado pelas células como substrato oxidante para mieloperoxidase, que por sua vez amplifica o potencial tóxico do peróxido de hidrogênio pela geração de outros potentes oxidantes como radical hidroxila, oxigênio singleto e ácido hipocloroso (Heinecke, 1999). O conjunto de radicais de oxigênio gerados na explosão respiratória é comumente chamado de intermediários reativos do oxigênio (IRO).

A geração de compostos tão tóxicos deve ser cuidadosamente controlada, de modo que, em neutrófilos circulantes, as enzimas responsáveis pela geração destes radicais estão inativas. A ativação da NADPH oxidase depende da ligação de componentes citosólicos (p47phox, p67phox e p40phox) ao flavocitocromo b_{558} . O flavocitocromo, composto por duas proteínas, gp91phox (ou NOX2, a isoforma encontrada em fagócitos) e p22phox, é o principal elemento transportador de elétrons da NADPH oxidase, ligado à membrana (**Figura 2**). Em neutrófilos o flavocitocromo está distribuído na membrana plasmática e também na membrana dos grânulos específicos, e é incorporada na membrana do fagolisossomo durante sua formação (Segal, 2005).

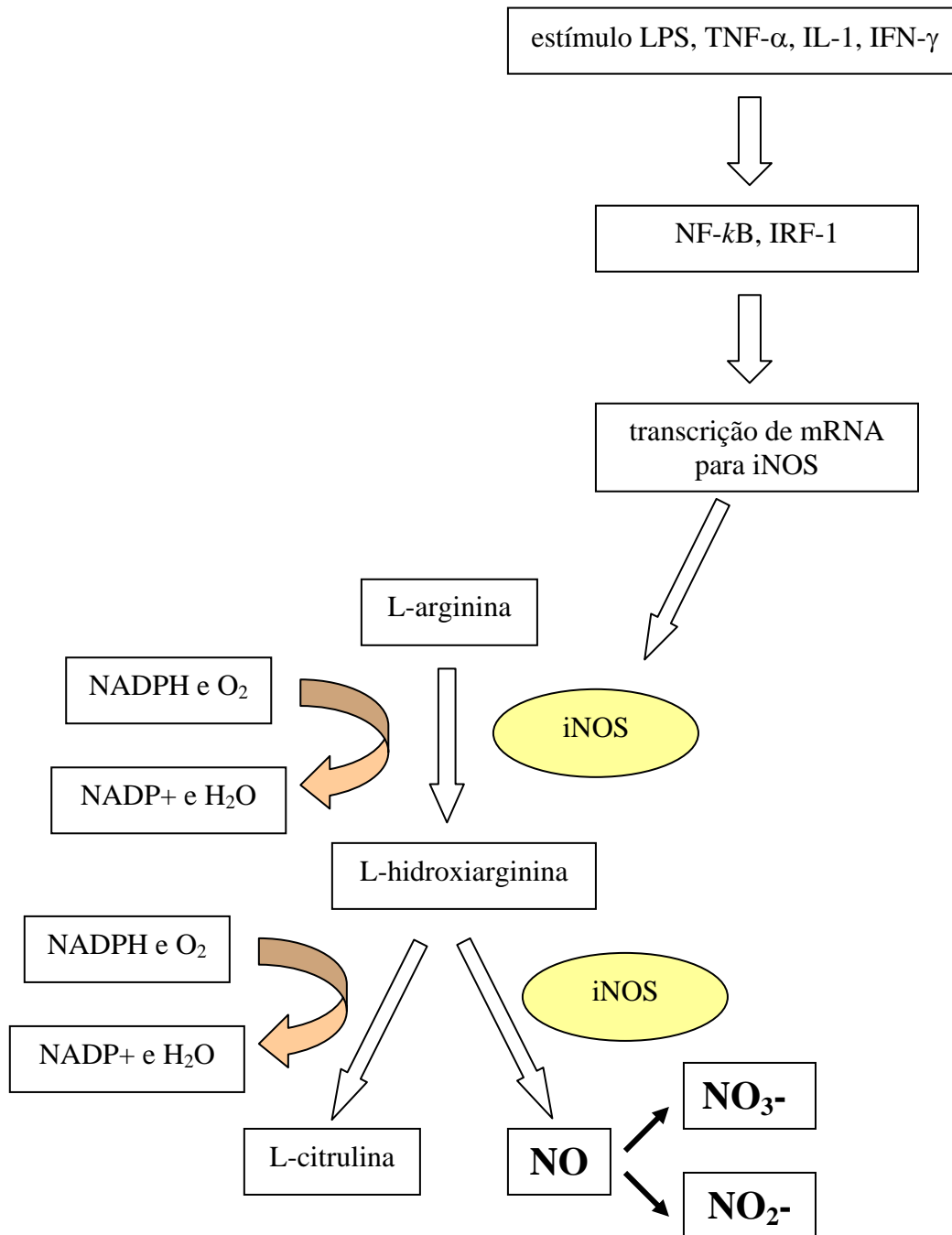


Figura 1. Esquema representativo do mecanismo de ativação da óxido nítrico sintase indutível e da biossíntese de óxido nítrico. A ligação de citocinas ou toxinas em receptores de membrana ativa os fatores de transcrição como NF- κ B, que inicia a transcrição do mRNA para iNOs (ou NOS-2). A iNOS catalisa duas reações de oxidação, uma para transformar o aminoácido L-arginina em L-hidroxiarginina e outra para produzir, a partir da L-hidroxiarginina, uma molécula de L-citrulina e uma de NO.

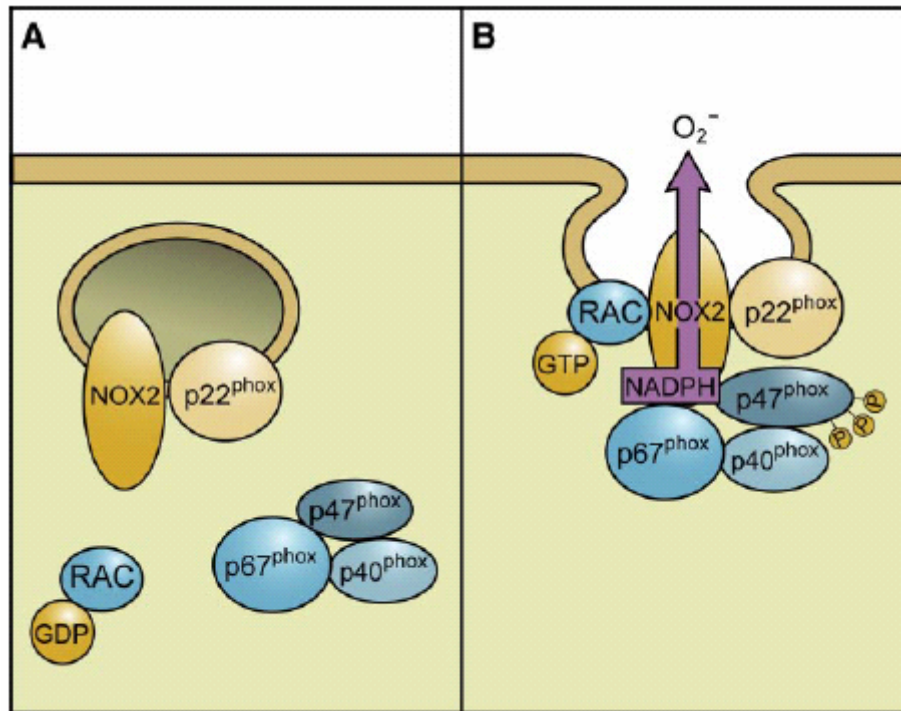
A proteína p40*phox* é ligada a p67*phox*, sendo provavelmente importante no transporte desta última até a membrana, e possui funções reguladoras do restante do complexo. A proteína p47*phox* é fosforilada em grande quantidade após a ativação da célula, sendo a primeira a ligar-se ao flavocitocromo de membrana.

Também é necessária a ligação da GTPase Rac ao complexo de membrana para a ativação da NADPH oxidase (Bedard & Krause, 2007). Esta ativação é dependente de proteína-quinase C (PKC), que causa a fosforilação dos componentes citosólicos, e ativadores de PKC, como PMA (*phorbol-myristate-acetate*). A ligação de uma grande variedade de antígenos em receptores de membrana dos neutrófilos é capaz de ativar a NADPH oxidase e a secreção de mieloperoxidase de forma extremamente rápida e sincrônica, de modo que a produção de O₂⁻ é iniciada 30 a 60 segundos após a ativação da célula (Heinecke, 1999).

O papel de neutrófilos na infecção por *Leishmania* spp.

Como mencionado anteriormente, a leishmaniose é uma doença que envolve complexas interações parasita-hospedeiro, com o curso da patologia dependendo tanto da espécie de *Leishmania* quanto de características imunes do hospedeiro. No estudo da infecção por este protozoário, a polarização Th1/Th2 da resposta imunológica, bem como a interação do parasita com sua célula hospedeira final, os macrófagos, têm sido os principais alvos de investigação. Entretanto, existem cada vez mais evidências da participação de outras células na modulação da resposta imune do hospedeiro a *Leishmania* spp.

Embora a interação deste protozoário com granulócitos seja menos investigada que a interação com macrófagos, estudos realizados com diferentes espécies de *Leishmania* e diferentes hospedeiros têm mostrado consistentemente que neutrófilos e eosinófilos são atraídos ao local da infecção do parasita logo nas primeiras horas (Pompeu *et al.*, 1991; Lima *et al.*, 1998; Amaral *et al.*, 2000). Este recrutamento, entretanto, é diferenciado para as linhagens de camundongo que apresentam respostas Th1 ou Th2 (Beil *et al.*, 1992), assim como a persistência destas células no sítio de infecção (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). De forma interessante, trabalhos mais recentes têm sugerido que neutrófilos possam ter papel importante na infecção, seja abrigando os parasitas vivos até a chegada dos macrófagos (Aga *et al.*, 2002; van Zandbergen *et al.*, 2004), seja inibindo a resposta dos macrófagos durante a infecção (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2005).



Bedard & Krause, 2007

Figura 2. Esquema representativo da ativação da NADPH oxidase. Em neutrófilos não ativados, NOX2 (*gp91phox*) e *p22phox* estão constitutivamente associadas e localizadas principalmente nas vesículas, formando o flavocitocromo de membrana b_{558} . Após ativação, *p47phox* é fosforilada, juntando-se a *p67phox* e *p40phox*. O processo também depende da GTPase Rac (em neutrófilos, Rac2). Estes componentes citosólicos, fosforilados por PKC, se ligam ao flavocitocromo, e o complexo ativo transporta elétrons do NADPH no citoplasma para oxigênio extracelular ou fagossomal para gerar superóxido.

Análises histoquímicas de lesões iniciais causadas pela infecção com *L. major* em camundongos BALB/c e C57BL/6 demonstraram que o infiltrado inflamatório nos camundongos resistentes é predominantemente composto por fagócitos mononucleares, enquanto que nos camundongos susceptíveis há uma predominância de células polimorfonucleares (Beil *et al.*, 1992). Entretanto, a depleção de neutrófilos em camundongos C57BL/6 elimina a característica de resistência destes camundongos e aumenta o número de parasitas encontrados nos linfonodos. A depleção destas células

também provoca uma infecção muito mais severa em camundongos susceptíveis BALB/c (Lima *et al.*, 1998), sugerindo um papel protetor para os neutrófilos em ambas as linhagens.

Entretanto, as variáveis envolvidas em experimentos de depleção podem fornecer resultados controversos, pois Chen e colaboradores (2005) obtiveram aumento da lesão em camundongos susceptíveis a *L. major* cujos neutrófilos foram depletados, e pouca influência da depleção destes fagócitos em camundongos C3H, normalmente resistentes. Quando neutrófilos são depletados *in vivo* por anticorpos anti-neutrófilos, pode ocorrer até mesmo reversão do fenótipo Th2 em camundongos susceptíveis (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000).

Alguns autores demonstraram um papel paradoxal para os neutrófilos neste modelo, sendo protetores para os camundongos resistentes e em parte responsáveis pelo direcionamento de uma resposta não protetora no camundongo susceptível (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Estes autores reportaram, também, um recrutamento diferenciado deste tipo celular nas duas linhagens. No camundongo resistente, foi encontrando um alto número de neutrófilos no sítio de infecção na primeira hora, que cai para menos de 10% das células do infiltrado inflamatório após três dias. No camundongo susceptível BALB/c os neutrófilos ainda são encontrados 10 dias após a infecção, em um processo extremamente relacionado aos macrófagos que são atraídos ao local para fagocitar as células apoptóticas.

Nesta linha, mais recentemente, surgiu a hipótese de que os neutrófilos, apesar de sua capacidade de eliminar o parasita internalizado, possam ser utilizados, em algumas circunstâncias, como “cavalos de Tróia” pelos parasitas, para entrarem de forma segura nos macrófagos (Aga *et al.*, 2002; Laufs *et al.*, 2002). Os autores desta teoria observaram parasitas vivos dentro de neutrófilos dois a três dias após a infecção experimental em camundongos, e comprovaram o atraso da apoptose espontânea de neutrófilos humanos infectados cultivados *in vitro*. Neste caso, a produção de citocinas e quimiocinas que atraem mais neutrófilos (como IL-8 em humanos) e da quimiocina MIP-1 β (que atrai monócitos, a célula hospedeira final) pelos neutrófilos infectados, poderia auxiliar no desenvolvimento da doença, ao invés de controlar a disseminação do parasita. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos contendo leishmanias ainda viáveis não causaria ativação do macrófago, que se tornaria desta forma, infectado pelo parasita (Laskay *et al.*, 2003; van Zandbergen *et al.*, 2004). Corroborando esta hipótese, Allenbach e colaboradores (2006)

observaram que a apoptose dos neutrófilos é exacerbada pela presença de *L. major*. Por este modelo, as promastigotas de *Leishmania* spp. seriam capazes de inibir a ação microbicida de neutrófilos como uma etapa para encontrar a célula hospedeira final, o macrófago.

Ribeiro-Gomes e colaboradores (2005), em um interessante trabalho onde neutrófilos dos camundongos C57BL/6 e BALB/c foram colocados em contato com macrófagos de sua própria linhagem e da outra linhagem, observaram um papel protetor nos neutrófilos de C57BL/6 e um papel deletério, favorecendo a inibição de macrófagos de ambas as linhagens, para neutrófilos de camundongos BALB/c. Assim, estes dados sugerem que os neutrófilos das duas linhagens de camundongo possam ter características intrínsecas diferentes.

O papel dos radicais tóxicos na leishmaniose

O momento imediatamente após a inoculação das promastigotas no hospedeiro mamífero pelo inseto vetor é crítico para o sucesso da infecção. As promastigotas, portanto, necessitam de estratégias muitas vezes diferentes das amastigotas que já se encontram em multiplicação no organismo hospedeiro, após o estabelecimento da resposta imune inicial.

Em macrófagos, cujas respostas imunes na leishmaniose estão mais bem documentadas que neutrófilos, a geração de uma resposta do tipo Th1 em camundongos resistentes a *L. major* induz a produção de NO, levando à eliminação do parasita (Stenger *et al.*, 1989). Já foi demonstrado *in vitro* que macrófagos de camundongos que respondem preferencialmente com uma resposta do tipo Th1, ditos macrófagos M-1, produzem mais NO do que macrófagos de camundongos que fazem preferencialmente uma resposta do tipo Th2, ditos M-2 (Santos *et al.*, 2006). Santos e colaboradores (2006) demonstraram ainda que a produção diferencial de NO em macrófagos é devido à produção diferencial de mRNA de iNOS e conseqüentemente da enzima iNOS.

Estudos já mostraram que os parasitas são capazes de inibir a produção de NO por macrófagos, e esta inibição pode ser determinante para o sucesso da infecção (Diefenbach *et al.*, 1998). Assim, linhagens de camundongo resistentes à infecção por *Leishmania* tornam-se susceptíveis quando nocauteados para iNOS.

É interessante ressaltar, no entanto, que a presença de IFN- γ parece ser crítica para a eliminação do parasita, pois macrófagos previamente expostos a esta citocina não são

inibidos pelo parasita (Gregory & Olivier, 2005). Nos macrófagos, a produção de NO é mediada também por TNF- α , uma citocina produzida durante a resposta do tipo Th1. Entretanto, em neutrófilos, a produção de NO é independente desta citocina (Fonseca *et al.*, 2003). Há controvérsias sobre a função leishmanicida do NO em neutrófilos, pois estas células produzem quantidades muito baixas destas moléculas quando comparadas aos macrófagos (Heinecke, 1999), entretanto, deve ser lembrado que estas são as primeiras células a migrarem para o local da infecção, e seu grande número pode compensar a menor produção.

Diferentes espécies de leishmania podem provocar diferentes respostas nos fagócitos. Gantt e colaboradores (2001) relatam que macrófagos de camundongos C3H, na presença de IFN- γ , produzem mais NO quando infectados por *L. chagasi* que os não infectados, não havendo portanto inibição da produção por esta espécie de *Leishmania*.

Além do óxido nítrico, cuja importância na eliminação do parasita é bem estudada, há evidências de que os neutrófilos são capazes de eliminar grande número de parasitas pela ação dos intermediários reativos do oxigênio (IRO) gerados durante a explosão respiratória, ou mesmo pela liberação de componentes tóxicos dos grânulos nos fagossomos (Pearson & Steigbigel, 1981; Pearson *et al.*, 1987; Pimenta *et al.*, 1987).

Para escapar da resposta imune inata, uma das estratégias utilizadas por promastigotas é inibir a explosão respiratória de neutrófilos. Esta inibição foi comprovada em estudos com neutrófilos humanos estimulados com PMA (Al-Tuwaijri *et al.*, 1990; El-On *et al.*, 1990). Estudos antigos, realizados em neutrófilos de coelho, demonstraram respostas bastante diversificadas quanto à inibição ou promoção da explosão respiratória para diferentes estágios e diferentes espécies de *Leishmania* (Mallinson *et al.*, 1989).

Algumas moléculas de superfície dos parasitas, como LPG e gp63, inibem a produção de intermediários reativos do oxigênio por fagócitos, incluindo neutrófilos (Remaley *et al.*, 1984; Gregory & Olivier, 2005), pela redução da atividade de PKC (proteína quinase-C). O LPG de *L. donovani* também possui papel importante na inibição da formação do complexo de ativação da NADPH oxidase (Lodge *et al.*, 2006). A produção de IRO parece importante para eliminação do parasita, uma vez que camundongos deficientes na produção destas moléculas possuem maior susceptibilidade à infecção por *L. donovani* (Murray & Natan, 1999), e a produção de IRO in vitro diminui a sobrevivência do parasita em macrófagos (Gregory & Olivier, 2005).

Algumas espécies de *Leishmania*, no entanto, podem ser mais resistentes a IRO que a NO. Liew e colaboradores (1990) mostraram que o tratamento com o inibidor de iNOS, L-NMMA (N-monometil-L-arginina), em camundongos infectados com *L. major*, não apenas inibiu a atividade leishmanicida como aumentou a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pelos macrófagos. Além disso, algumas moléculas ativadoras de neutrófilos, como fMLP, podem causar tanto a produção de NO quanto de IRO, sugerindo passos em comum na cascata de ativação. Já foi sugerido que pelo menos parte dos passos em comum pode se localizar na cascata de ativação da NADPH oxidase em neutrófilos humanos, causando interferência na produção de IRO pela ativação da produção de NO (Carreras et al., 1997).

Desta forma, a produção de NO e IRO por neutrófilos pode ter grande importância na eliminação de *L. major*, e diferenças entre estes dois mecanismos podem ser decisivas para uma posterior evolução da doença no camundongo susceptível ou para a regressão da lesão no camundongo resistente.

JUSTIFICATIVA

As leishmanioses encontram-se em franca expansão em nosso país, sendo que as medidas de controle têm sido ineficazes para evitar o aumento do número de casos. Novas estratégias só serão possíveis mediante pesquisa de todos os aspectos da doença, desde a proliferação do vetor até os aspectos imunológicos relacionados com esta infecção, que poderão permitir manipulações terapêuticas do sistema imune ou desenvolvimento de vacinas. No modelo animal de infecção por diversas espécies de *Leishmania*, duas linhagens de camundongo são frequentemente utilizadas por suas respostas típicas à espécie *L. major*: a linhagem BALB/c, que é susceptível à infecção e desenvolve lesões que visceralizam com o tempo e terminam por matar o animal, e a linhagem C57BL/6, que desenvolve lesões que, entretanto, regridem com o passar das semanas. Estas respostas são complexas e envolvem grande número de citocinas e quimiocinas, além de diversos tipos celulares. Os neutrófilos são células que migram rapidamente logo após o início da infecção, e cada vez mais se demonstra a importância destas células para o desenvolvimento da patologia no caso de várias infecções por parasitas intracelulares, incluindo a leishmaniose. Assim, é interessante e importante investigar a resposta de mecanismos microbicidas de neutrófilos das linhagens resistentes e susceptíveis à infecção por *L. major*, tentando apontar diferenças que possam contribuir para a expressão destes dois fenótipos.

OBJETIVO GERAL

Uma vez que os neutrófilos estão entre as primeiras células que têm contato com os patógenos, estas células podem ter um papel determinante no modelo de resistência e susceptibilidade a *L. major*. Em estudos anteriores, observamos que, enquanto a taxa de fagocitose não foi diferente nas duas linhagens-modelo de camundongos, a produção de moléculas microbidas revelou aspectos que mereceram estudos mais detalhados.

Assim, nosso objetivo, neste estudo, foi investigar a produção diferencial de NO e IRO em neutrófilos das linhagens de camundongos C57BL/6 e BALB/c, na tentativa de estabelecer uma correlação com resistência e susceptibilidade à infecção por *L. major*. Além disso, buscamos investigar o efeito da interação neutrófilo-protozoário sobre a produção dessas moléculas microbidas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Avaliar, *in vitro*, a produção de óxido nítrico em neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, após estímulo com LPS e IFN- γ .

2) Avaliar, *in vitro*, a expressão de iNOS em neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, após estímulo com LPS e IFN- γ .

3) Determinar, *in vitro*, a produção de intermediários reativos do oxigênio (IRO) em neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, após estímulo com PMA, LPS e IFN- γ .

4) Determinar, *in vitro*, a expressão de proteínas componentes da NADPH oxidase, p40*phox* e p47*phox*, em neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6, com ou sem o estímulo de PMA.

5) Avaliar, *in vitro*, se a produção de óxido nítrico, a expressão de iNOS, a produção de IRO e a presença de componentes da NADPH oxidase em neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 são afetadas pela presença de promastigotas de *L. major*.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos

Foram utilizadas fêmeas de camundongos C57BL/6 e BALB/c, linhagens que apresentam, respectivamente, um quadro de resistência e susceptibilidade à infecção por *L. major*. Os animais foram adquiridos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG e tratados com vermífugo composto de sulfóxido de albendazol a 10% (Ricobendazole 10, Ouro Fino Saúde Animal Ltda), diluído 1:250 em água filtrada, oferecida aos animais recém-adquiridos durante 24 horas e em seguida trocada por água filtrada sem o medicamento. Este tratamento era repetido após 10 dias. A maravalha e as caixas onde os camundongos eram mantidos foram previamente borrifadas com amitraz a 12,5% (Triatox Sarnicida e Carrapaticida, Coopers Brasil Ltda) e deixadas até secagem completa antes da colocação dos animais. Os animais foram utilizados entre 8 e 12 semanas de idade.

Este trabalho seguiu os princípios éticos para utilização de animais de experimentação descritos nas normas do CETEA (Comitê de Ética em Experimentação Animal) da UFMG. Todos os protocolos utilizados foram previamente aprovados pelo CETEA, conforme processo nº 102/04.

Leishmania major

As promastigotas de *L. major* (MHOM/SU/73/5-ASKH) utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Dr. Gabriel Grimaldi (Fiocruz - RJ) e mantidas estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Biologia Celular e Imunologia das Doenças Parasitárias do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG. Após descongelamento, as promastigotas foram cultivadas em *Schneider's Insect Medium* (SIGMA). Este meio foi preparado conforme instruções do fabricante e esterilizado por filtração a vácuo, utilizando membrana com porosidade de 0,22 µm (Millipore). Ao meio estéril, no momento de uso, adicionou-se 10% v/v de soro fetal bovino (Cultilab) inativado por calor (SFBi) a 56°C por 30 min.

Os parasitas foram mantidos a 24°C em estufa BOD (Divco) até, no máximo, a sexta passagem, quando eram inoculados em camundongos BALB/c com objetivo de recuperar a infecciosidade.

Manutenção de *Leishmania major* em camundongos

A utilização de parasitas até o máximo de 6 passagens in vitro foi possível pela manutenção continuada de camundongos BALB/c infectados, obtidos pela inoculação de 1×10^4 promastigotas na pata traseira do animal, diluídas em 10 μ L de PBS. As promastigotas foram obtidas de cultivos in vitro com no máximo 6 passagens.

Após intumescimento do local de inoculação (cerca de 4 semanas), as formas amastigotas foram isoladas a partir de um fragmento de tecido retirado assepticamente da lesão e colocado em frasco com 5 mL de meio de cultivo *Schneider* contendo 10% SFBi, penicilina (50 U/mL) e estreptomicina (50 μ g/mL).

O frasco era incubado a 24°C, de modo que os parasitas se diferenciavam em formas promastigotas. Após multiplicação dos parasitas, em torno do 5º dia, as promastigotas eram contadas e repicadas para 2 novos frascos, e as culturas obtidas de ambos os frascos eram congeladas após 4 a 5 dias de incubação, ou utilizadas nos experimentos.

Congelamento dos parasitas

Para congelamento de estoques de promastigotas de *L. major*, os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e diluídos em meio *Schneider* contendo 10% SFBi e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) para uma concentração final de 5×10^7 parasitas/mL. Esta suspensão foi distribuída em criotubos estéreis de 1,5 mL (1 mL/criotubo) que foram colocados a -20°C *overnight*. Os criotubos foram então transferidos para nitrogênio líquido.

Manutenção das culturas axênicas de *Leishmania major*

As promastigotas recém-isoladas de camundongos BALB/c eram mantidas em meio *Schneider* suplementado com 10% SFBi. A cada 4-5 dias, quando os parasitas se encontram em início de fase estacionária, e o número de promastigotas metacíclicas é maior, era realizado o repique das culturas após a contagem das promastigotas. Para isto, uma alíquota da cultura era diluída (1:50) em PBS (*Phosphate Buffered Saline*; NaCl 136,9 mM; KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM) contendo 1% de formol e contada em câmara de Neubauer. Para os repiques, eram semeados $1,0 \times 10^6$ parasitas/mL, em um total de 5 mL de meio para cada 25 cm² de superfície do frasco de cultivo. As

culturas eram examinadas periodicamente em microscópio ótico invertido (Olympus) para verificar a ausência de contaminação. Com o objetivo de trabalhar apenas com parasitas apresentando uma alta infecciosidade in vitro, as promastigotas foram utilizadas até, no máximo, a sexta passagem. Nos experimentos de infecção de neutrófilos foram utilizadas culturas no 5º dia após repique.

Separação de granulócitos da cavidade peritoneal de camundongos

Granulócitos peritoneais murinos foram obtidos por inoculação de 2 mL de tioglicolato (*Bacto-Thyoglycolate Broth without indicator*, DIFCO) a 3% (preparado conforme instruções do fabricante) na cavidade peritoneal de cada camundongo, 3 horas antes de cada experimento. Após este tempo, os animais eram sacrificados por deslocamento cervical, e a pele lavada com álcool 70%. A pele era retirada com auxílio de tesoura e pinça, e era feita uma incisão na cavidade peritoneal. As células foram recolhidas por lavagem da cavidade peritoneal com 4 mL de PBS e a suspensão foi cuidadosamente colocada sobre gradiente de Ficoll-Hypaque (Ficoll 400: *GE Healthcare*; Hypaque 50%: Diatrizoato de sódio a 50%, solução injetável, *Winthrop*). O gradiente foi então centrifugado para separação dos outros tipos celulares presentes no peritônio, de acordo com o protocolo descrito por Rest (1988). Para cada experimento foi feito um *pool* de células retiradas de no mínimo três animais de cada linhagem.

O gradiente de Ficoll-Hypaque foi feito colocando-se 5 mL da solução preparada (8 mL de Ficoll 7,6% em água e 2 mL de Hypaque 50%) em tubos de centrífuga de 15 mL. Cerca de 5 mL de suspensão celular eram colocados vagarosamente sobre o gradiente formado, centrifugando-se em seguida a 600 g por 30 minutos.

Após a centrifugação, o sedimento contendo os neutrófilos foi diluído cuidadosamente em PBS. Os neutrófilos foram lavados em PBS e a seguir em meio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA) com 10% de soro fetal bovino inativado.

Com objetivo de melhorar o processo de purificação, foi acrescentado mais um passo de separação, consistindo na incubação das células em placa de Petri descartável por 40 minutos a 37°C para adesão de macrófagos ainda presentes na suspensão. As células não aderidas eram recolhidas da placa e contadas em câmara de Neubauer, na presença do corante vital azul de tripan (0,4% em PBS) para análise concomitante da viabilidade. Cada animal forneceu em média 5×10^6 neutrófilos, entretanto, foram obtidos cerca de 20% a mais de neutrófilos em camundongos BALB/c que em camundongos C57BL/6.

Após este processo, a pureza das células obtidas chegou a mais de 99% de neutrófilos, confirmada após *cyto spin* da suspensão celular e coloração das lâminas com May-Grünwald-Giemsa.

Determinação da produção de óxido nítrico

Para a pesquisa da produção de óxido nítrico (NO), $1,5 \times 10^6$ neutrófilos de camundongos C57BL/6 e BALB/c foram incubados em meio RPMI com 10% SFBi na ausência e na presença dos estímulos inespecíficos LPS e IFN- γ , individualmente ou em combinação. As células foram incubadas em placas de 24 poços, por tempos que variaram de 2 a 48 h a 37°C, em estufa com 5% de CO₂. Foram utilizadas concentrações de 0,1 a 100 ng/mL de LPS (SIGMA) ou de 5 a 100 UI/mL de IFN- γ (R&D Systems). As concentrações de 0,1, 10, 50 e 100 ng/mL de LPS foram testadas em conjunto com concentrações de 5 a 100 UI/mL de IFN- γ . Os neutrófilos dos camundongos C57BL/6 e BALB/c também foram incubados com promastigotas de *L. major*, em início de fase estacionária, na proporção de 0,1 a 10 parasitas:célula, na presença de 0,1 a 10 ng de LPS em conjunto com 50 UI de IFN- γ por 4 a 24 h, a 37°C em 5% de CO₂.

Para detecção de produção de óxido nítrico também foram utilizados parasitas mortos pelo calor para interação com neutrófilos. Para isto, as promastigotas foram contadas, diluídas em PBS sem soro fetal e fervidas por 2 minutos.

Após incubação das células, a suspensão foi centrifugada (500 g, 10 min). A produção de NO foi avaliada pela dosagem do nitrito (NO₂⁻, metabólito final mais estável resultante da redução do NO) presente no sobrenadante, detectado pela coloração de Griess modificada de acordo com Giustarini e colaboradores (2004) e descrita a seguir.

Coloração de Griess

Para determinação colorimétrica da quantidade de NO no sobrenadante, foram adicionados 10µL de NEM (*N-ethyl-maleimide*) 310 mM, 300 µL de solução saturada de sulfanilamida em álcool etílico absoluto e 150 µL de solução de sulfanilamida a 6% (w/v) e NEED (*N-naftil-ethylendiamine*) 0,2% (w/v) em ácido fosfórico a 6% a cada microtubo contendo 500µL do sobrenadante.

Após 5 minutos, acrescentou-se 80 µL de ácido tricloroacético 60%. Após uma rápida centrifugação em microcentrífuga a 10.000 g por 2 minutos, 200 µL de sobrenadante foi colocado em microplaca e analisado em espectrofotômetro a 540 nm.

Paralelamente foi feita uma curva-padrão de NaNO₂ com concentrações variando de 100 a 3,125 µM. Meio RPMI 1640 foi utilizado como branco.

Os resultados foram comparados com a curva padrão e mostrados em µM de óxido nítrico produzido.

Deteccão da enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS)

Estímulo dos neutrófilos para a expressão de iNOS

A expressão de iNOS foi investigada em $1,5 \times 10^6$ neutrófilos de camundongos C57BL/6 e BALB/c após incubação das células a 37°C e 5% CO₂ com LPS (0,1 ng/mL) e IFN-γ (50 UI/mL), na presença ou ausência de *L. major*, na proporção de 1 ou 10 parasitas:célula, por períodos de tempo que variaram de 1 a 48 horas.

Após incubação, a suspensão celular foi centrifugada a 300 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para deteção de óxido nítrico conforme descrito acima e o sedimento foi diluído em 50 µl de tampão de lise (HEPES/NaOH 20 mM, EDTA 0,1 mM, 1% Triton X-100, 2 µg/mL de aprotinina, pH 7,5), conforme descrito por Noda & Amano (1997).

A suspensão foi incubada por 30 minutos a 4°C e a seguir centrifugada por 10 minutos (10.000 g, 4°C). O sobrenadante foi cuidadosamente coletado (descartando-se o sedimento), avaliado quanto à concentração de proteínas e congelado a -20°C até o momento de uso.

Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas do sobrenadante, obtido conforme descrito acima, foi feita com os reagentes *BioRad DC Protein Assay* (BioRad), de acordo com as instruções do fabricante. Em microplaca de 96 poços eram adicionados 5 µL do lisado ou de soroalbumina bovina, utilizada como padrão protéico, em concentrações que variavam de 2 a 0,125 mg/mL. A seguir eram adicionados 50 µL do reagente A e 200 µL do reagente B. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, a leitura era feita em espectrofotômetro a 750 nm.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Alíquotas de cada amostra contendo 20 ou 30 µg de proteína foram fracionadas em SDS-PAGE utilizando-se um gel de separação de 7,5%. O gel foi preparado com uma solução de 40% acrilamida/bis-acrilamida na proporção 29:1 em Tris-HCl 375 mM pH 8,8

e 0,1% SDS (LaemmLi). O gel de concentração foi preparado em Tris-HCl 125 mM pH 6,8 e 0,1% SDS contendo 4% de acrilamida/bis-acrilamida.

As amostras foram diluídas em tampão de amostra (1mM EDTA, 10% SDS, 20% glicerol, 0,05% azul de bromofenol e 5% β -mercaptoetanol), para um volume final de 20 μ L e desnaturadas a 100°C por 5 minutos, antes de aplicadas ao gel. Como padrão de peso molecular foi utilizado o padrão *BenchMark* (Invitrogen), de 15 a 220 kDa, uma vez que a proteína iNOS possui 130 kDa.

A corrida foi realizada em voltagem constante de 150 V por 1 hora, utilizando-se o tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8,3, contendo 0,1% SDS. Após a separação das proteínas, o gel foi utilizado em ensaios de *Western blot*, como descrito a seguir.

Western blot para iNOS

As proteínas fracionadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose PROTRAN (*Pure Nitrocellulose Transfer and Immobilization Membrane*, 0.45 μ m, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) a 100 V durante 1 hora, em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20% v/v). Após transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (0,1% Ponceau S e 3% de ácido acético) para a visualização das bandas correspondentes às proteínas, deixando-se a membrana no corante por alguns segundos. O excesso de corante foi retirado com água e cada banda do padrão de peso molecular foi marcada com um furo na membrana. A seguir, o corante foi totalmente retirado com água e a membrana foi incubada em tampão de bloqueio (PBS contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,05% de Tween20) durante 1 hora em temperatura ambiente, ou *overnight* a 4°C.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada em PBS com Tween20 0,05% e a seguir incubada com IgG policlonal de coelho anti-iNOS de camundongo (NOS-2 - M-19, 200 μ g/mL anti-iNOS de camundongo, Santa Cruz Biotechnology, USA) diluído 1:400 em PBS contendo 1% de albumina e 0,05% Tween20 durante 1 hora em temperatura ambiente, ou *overnight* a 4°C.

Após 3 lavagens de 15 minutos em PBS com Tween20 0,05%, a membrana foi incubada no segundo anticorpo, anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (SIGMA) diluído 1:20.000 em PBS com 1% albumina e 0,05% Tween20. Após 1 hora à temperatura ambiente, a membrana foi novamente lavada com PBS sem Tween20, tratada com ECL (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Lumingen PS-3) por 5 minutos e

revelada em filme para raio-X (*T-MAT G/RA FILM, KODAK*) por tempos de 15 segundos a 2 minutos.

Determinação da explosão respiratória

Para a quantificação da explosão respiratória, foi utilizado o método de quimioluminescência, que consiste em detectar a luz emitida pela reação de Luminol com os radicais de oxigênio produzidos (superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio).

Em uma placa de 96 poços (*C96 White MaxiSorp Fluoronunc*, Nalge Nunc International), foram adicionados 20 µL de Luminol (SIGMA) a 5×10^{-4} M em PBS para se obter uma concentração final de 10^{-4} M, ao atingir o volume de 100 µL. Em seguida, foram adicionados 5×10^5 neutrófilos peritoneais de cada linhagem de camundongo em 50 µL de meio RPMI sem indicador de pH (SIGMA), com 10% SFBi. Foram utilizadas células diluídas em meio contendo ou não 0,1 ng/mL de LPS e 50 UI de IFN- γ ou células previamente incubadas por 18 horas em meio contendo ou não 0,1 ng/mL de LPS e 50 UI de IFN- γ . Para avaliação da explosão respiratória na presença de *L. major*, foram adicionados a cada poço 5×10^6 promastigotas diluídas em 10 µL de PBS.

Imediatamente antes da leitura, foi adicionado PMA (*Phorbol-Myristate-Acetate*) para uma concentração final de 20 ng/mL. Poços contendo PBS e Luminol ou PBS, Luminol e PMA foram utilizados para obtenção dos valores de *background*. Poços com PBS, Luminol e neutrófilos foram utilizados como controle.

As leituras foram realizadas em intervalos de 1 minuto, durante 1 hora. A emissão de luz foi detectada em Luminômetro *Packard Lumi-Count* e expressa em cada gráfico como unidades arbitrárias de leitura.

Os resultados foram expressos como área sob a curva obtida no intervalo de 1 hora, calculada como se segue:

$$I = h [f_2 + f_3 + \dots + f_{(n-1)}] + (f_1 + f_n) h/2$$

Onde:

I = área sob a curva

h = intervalo de tempo

f_1, f_2, \dots, f_n = unidades de leitura nos tempos 1, 2, ..., n. (n medidas)

Citometria de fluxo

Para avaliação da pureza e para subsequente análise em microscopia confocal, os neutrófilos isolados foram analisados em citometria de fluxo. Resumidamente, 1×10^6 células foram diluídas em PBS e colocadas em microtubos. Foi feito o bloqueio dos receptores de Fc adicionando-se soro autólogo de camundongo (para concentração final de 10%) e incubando-se por 30 minutos a 4°C. Após este tempo foram realizadas duas lavagens com PBS. A seguir, as células foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo RM6501, marcado com FITC (Caltag), contra o antígeno 7/4 de células polimorfonucleares de camundongo, diluído 1:40 em PBS com 0,25% de BSA (albumina sérica bovina) e 1 mM de azida de sódio.

As células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 2% em PBS por 45 minutos em temperatura ambiente. A seguir as células foram lavadas duas vezes com PBS com BSA e azida de sódio. A aquisição dos dados foi feita com o citômetro *FACScalibur* (Becton-Dickinson, USA), localizado no Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, e foram utilizados os programas *Cell-Quest* (para McIntosh) ou *WinMDI* (para Windows) para o estoque dos dados e identificação das populações celulares, em gráficos de distribuição puntual em função do tamanho (FSC, *forward scatter*) por granulosidade (SSC, *side scatter*) ou tamanho por fluorescência 1 (FL1).

Deteção dos componentes da enzima NADPH oxidase

Estímulo dos neutrófilos para deteção das proteínas

A expressão de p40*phox* e p47*phox* foi investigada em neutrófilos de camundongos C57BL/6 e BALB/c após incubação das células por 1 hora a 37°C e 5% CO₂ com ou sem PMA (200 ng/mL), na presença ou ausência de promastigotas de *L. major*, em fase estacionária de crescimento, na proporção de 10 parasitas:célula.

Microscopia confocal

Os neutrófilos foram isolados de camundongos BALB/c e C57BL/6 conforme descrito, contados e plaqueados (final 2×10^6 células por mL, 500 μ L em cada poço) em placas de 24 poços com lamínulas redondas previamente tratadas com soro fetal bovino. Alguns poços foram tratados com PMA a 200 ng/mL.

As promastigotas foram contadas, centrifugadas a 1000 g, diluídas em CFSE (2 µL em 2 mL de PBS sem soro) e incubadas protegidas da luz por 10 minutos a 37°C. A seguir foram acrescentados 10 mL de meio RPMI gelado com 10% de soro fetal bovino. A suspensão foi centrifugada a 1000 g, 4°C por 10 minutos. Após nova lavagem em meio gelado, as promastigotas foram adicionadas às células na proporção de 10 parasitas por célula, mantendo-se toda a preparação sempre ao abrigo da luz.

As células foram incubadas por 1 hora na presença ou na ausência do parasita e na ausência ou presença de estímulo com 200 ng/mL de PMA. Para a marcação com anticorpos, em cada troca de solução a placa foi centrifugada a 70 g por 5 minutos para reduzir a perda de células, pois os neutrófilos não aderem bem às lamínulas.

Foi feito o bloqueio dos receptores de Fc adicionando-se soro autólogo de camundongo a 10% em PBS e incubando-se por 30 minutos a 4°C. Em seguida foram realizadas 2 lavagens com PBS em temperatura ambiente. Nos casos em que foi utilizado anticorpo de superfície, as células foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo RM6501, marcado com FITC (Caltag), contra o antígeno 7/4 de células polimorfonucleares de camundongo, diluído 1:40 em PBS com 0,25% de BSA e 1 mM de azida de sódio.

As células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 2% em PBS. As células foram, a seguir, permeabilizadas com saponina 0,5% em PBS com 0,5% de BSA e 2 mM de azida (tampão de permeabilização) por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado o primeiro anticorpo (diluído 1:20 em PBS com 0,25% de BSA e 1 mM de azida de sódio) contra as proteínas componentes da NADPH oxidase. Foram utilizados os anticorpos anti-p40*phox* (sc18253) e anti p47*phox* (sc7660), em cabra, todos da Santa cruz Biotechnology, USA. As células foram incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente.

A seguir as células foram lavadas duas vezes com tampão de permeabilização antes da adição do segundo anticorpo, anti-cabra, diluído 1:200 em tampão de permeabilização, marcado em vermelho com Cy-3, cedido pelo Dr. Greg Kitten, do Departamento de Morfologia da UFMG. As células foram incubadas no segundo anticorpo por 1 hora a temperatura ambiente e a seguir lavadas uma vez com tampão de permeabilização e uma vez com PBS com BSA e azida de sódio.

O núcleo das células foi marcado com DAPI diluído 1:300 em PBS com 2% de BSA, com incubação durante 40 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas

duas vezes com PBS e montadas com meio de montagem não fluorescente (*Hydromount* - National Diagnostics, USA).

Todas as operações foram realizadas ao abrigo da luz.

Foram feitos controles de isotipo para cada variável testada, seguindo-se o protocolo normalmente na ausência do anticorpo contra componentes da NADPH oxidase e acrescentando-se o segundo anticorpo marcado com Cy-3 da mesma forma que nos outros poços de teste.

As imagens foram capturadas utilizando-se objetiva de imersão em microscópio confocal *Carl Zeiss* acoplado ao *Laser Scanning System LSM510*, localizado no CEMEL (Centro de Microscopia Eletrônica) - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG e analisadas no programa *LSM Image Browser*. Todas as imagens obtidas no mesmo dia para as condições controle e teste foram adquiridas utilizando os mesmos parâmetros como força do laser, ganho, níveis de cinza e abertura da íris, para permitir comparação entre as imagens controle e teste do mesmo dia.

Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão de células consideradas positivas em relação ao controle de isotipo individual de cada variável, sendo contadas 100 células em cada experimento.

Análise estatística

Foi utilizado, para dados paramétricos, teste *t* de Student para verificar significância das diferenças entre dados independentes, e para dados não paramétricos, teste de Mann-Whitney para dois grupos de dados independentes. Para dois grupos de dados paramétricos dependentes, como verificação de variação dentro da mesma linhagem de camundongo após estímulo, foi usado teste *t* pareado. Os testes foram realizados utilizando-se o programa GRAPH PAD PRISM versão 3.00.

RESULTADOS

Viabilidade dos neutrófilos em cultivo

Neutrófilos são células conhecidas por apresentar uma curta meia-vida no sangue periférico. Para as pesquisas realizadas *in vitro* é importante o acompanhamento de sua viabilidade uma vez que experimentos longos podem fornecer resultados referentes a um número muito menor de células do que o inicialmente estabelecido. Desta forma, primeiramente, determinamos a viabilidade de neutrófilos peritoneais murinos, mantidos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% SFBi, a 37°C e 5% CO₂, por até 48 horas. Utilizando o teste de viabilidade de exclusão do corante vital azul de tripan verificamos que, logo após a extração, 97% a 100% dos neutrófilos obtidos, tanto da linhagem BALB/c quanto de C57BL/6, estavam viáveis (**Fig. 3**). Após 4 horas de cultivo *in vitro*, a viabilidade das células de ambas as linhagens de camundongos diminui para cerca de 85-90%, e gradativamente chega a 55-60% em 18 h. Após 24 h de cultivo *in vitro*, a grande maioria das células (cerca de 80%) perde a viabilidade. Esse mesmo padrão de viabilidade foi observado na presença de IFN- γ e LPS, ativadores que foram utilizados neste trabalho (resultados não mostrados).

Produção de óxido nítrico por neutrófilos murinos

Já foi demonstrado que macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6, respectivamente susceptíveis e resistentes à infecção por *L. major*, possuem uma sensibilidade diferencial aos estímulos de IFN- γ e LPS (ou TNF- α) para a produção de NO (Santos *et al.*, 2006), um dos principais efetores envolvidos na eliminação de diversos patógenos. No presente estudo, investigamos, inicialmente, a capacidade dos neutrófilos de camundongos BALB/c e C57BL/6 de produzir NO na presença de estímulos como LPS e IFN- γ . Utilizamos os dois estímulos separadamente ou simultaneamente.

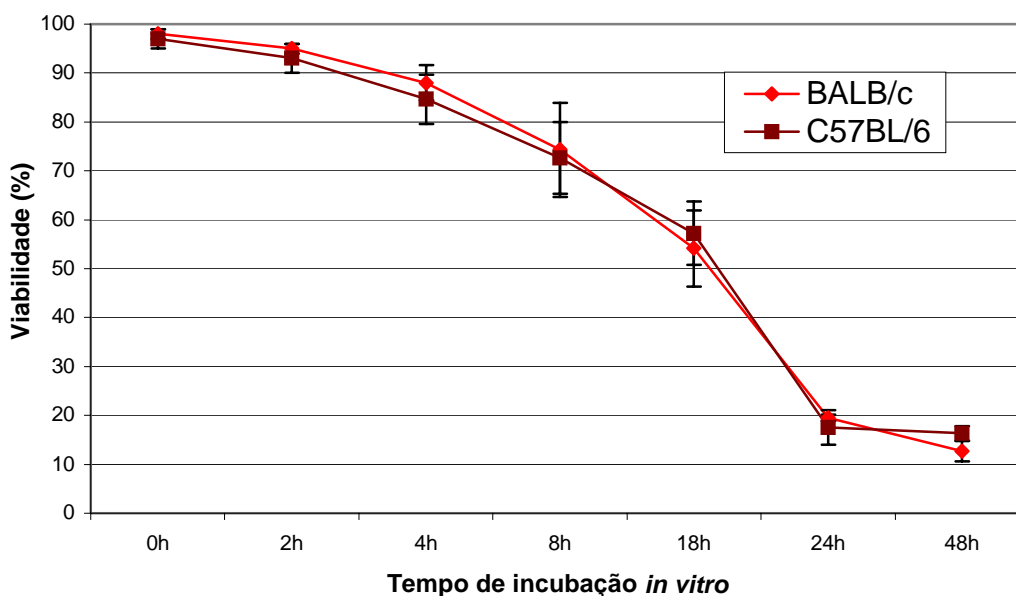


Figura 3. Viabilidade de neutrófilos peritoneais murinos durante cultivo *in vitro*. Neutrófilos de no mínimo 3 camundongos de cada linhagem foram recolhidos e isolados em gradiente de Ficoll-Hypaque 3 h após inoculação de tioglicolato na cavidade peritoneal. As células foram cultivadas em meio RPMI 10% SFBi por diferentes intervalos de tempo. A cada tempo o número de células viáveis era determinado por exclusão do corante vital azul de tripan e contagem em câmara de Neubauer.

Na ausência de IFN- γ e LPS, não há produção detectável de NO pelos neutrófilos murinos nos intervalos de tempo de 4, 8, 12, 18 e 24 h (resultados não mostrados e controles nas **Figs. 4 e 5**). Em concentrações que variaram de 0,1 a 100 ng/mL e em tempos de incubação que variaram de 4 a 24 horas, o LPS isoladamente não foi capaz de induzir uma produção detectável de NO (dados não mostrados).

Quando estimulados apenas com IFN- γ , em concentrações que variaram de 5 a 100 UI/mL, os neutrófilos de camundongos C57BL/6 produziram NO de forma concentração-dependente, após 18 h de incubação a 37°C (**Fig. 4**). Os neutrófilos de camundongos BALB/c atingem a produção máxima em concentrações de cerca de 25 UI/mL de IFN- γ . Em tempos menores, embora a viabilidade celular seja maior, não foi possível detectar a produção de NO pelas células das duas linhagens de camundongos (dados não mostrados).

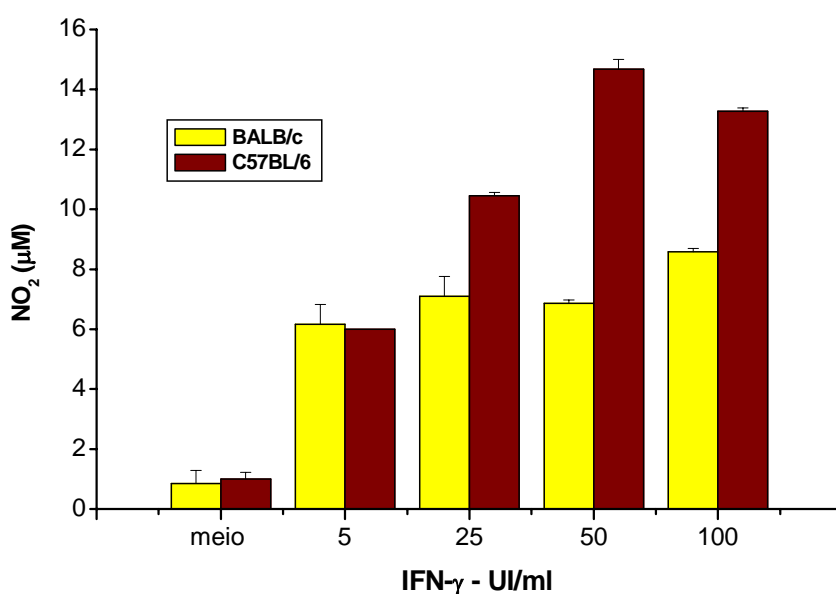


Figura 4. Produção de NO por neutrófilos murinos após estímulo com IFN- γ .

Um total de $1,5 \times 10^6$ neutrófilos peritoneais foram cultivados a 37°C em meio RPMI 10% SFBI, por 18 horas, na presença de diferentes concentrações de IFN- γ . A detecção de NO foi feita pela coloração de Griess no sobrenadante da cultura, após centrifugação a 500 g. Experimento representativo de 3 semelhantes.

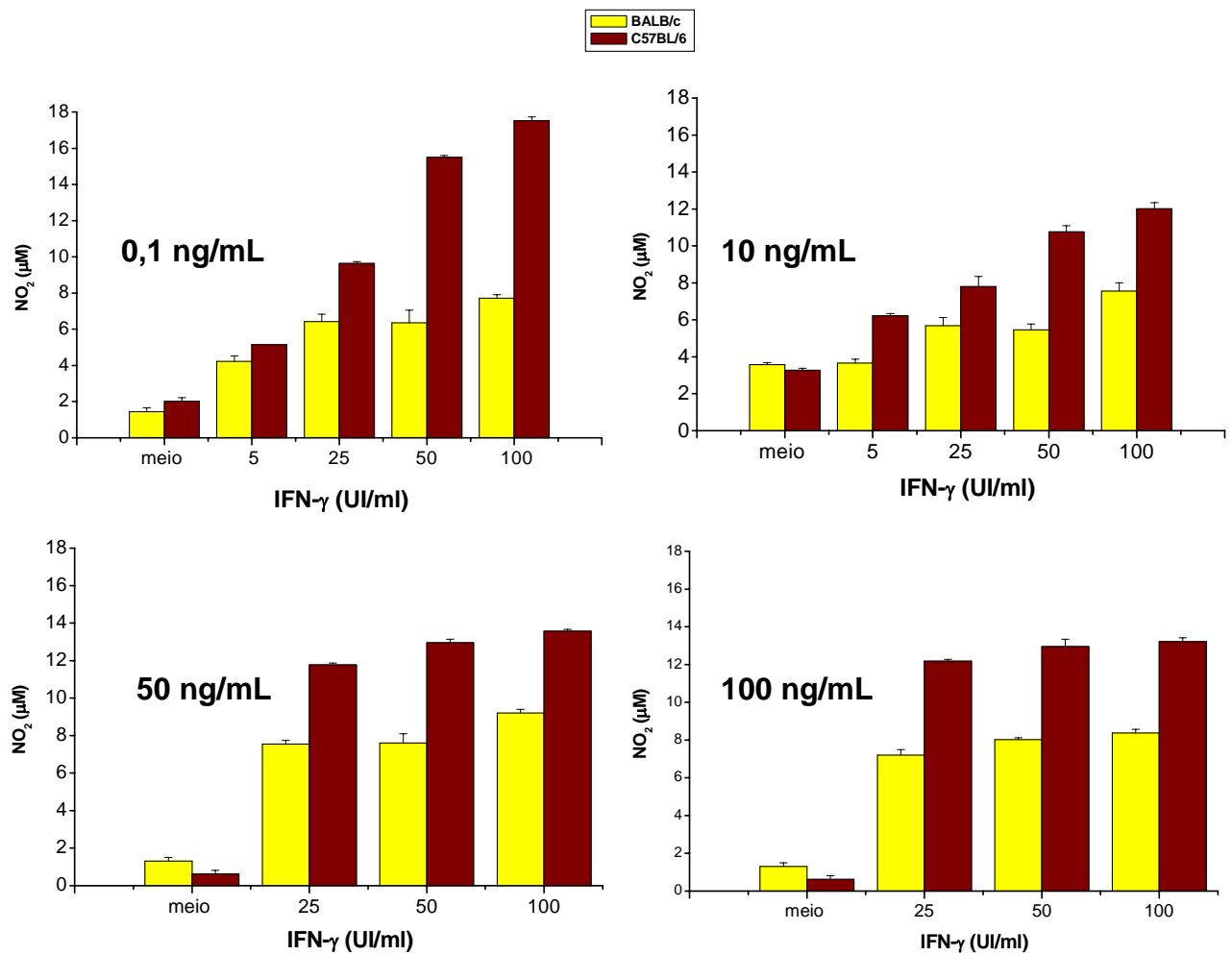


Figura 5. Produção de NO por neutrófilos murinos em diferentes concentrações de LPS e IFN- γ . Um total de $1,5 \times 10^6$ neutrófilos peritoneais foram cultivados a 37°C em meio RPMI 10% SFBi, por 18 horas, na presença das concentrações indicadas de IFN- γ (na abscissa) e LPS (dentro de cada quadro). A detecção de NO foi feita pela coloração de Griess no sobrenadante da cultura. Experimento representativo de 3 semelhantes.

Nossos resultados mostram também que, com doses maiores que 5 UI/mL de IFN- γ , os neutrófilos de camundongos C57BL/6 produzem consideravelmente mais NO que as células da linhagem BALB/c. Entre as concentrações utilizadas, esta diferença foi mais evidente a partir de 50 UI/mL de IFN- γ . Nestas concentrações as células de C57BL/6 produziram 50 a 100% a mais de NO que neutrófilos de BALB/c. Observamos ainda que os neutrófilos de BALB/c atingem um platô na produção de NO quando cultivados na presença de estímulos maiores que 25 UI/mL de IFN- γ . Por outro lado, as células da linhagem C57BL/6 continuam respondendo ao aumento das concentrações de IFN- γ (**Fig. 4**).

A associação de LPS e IFN- γ não modificou de forma significativa o padrão de produção de NO dos neutrófilos em ambas as linhagens de camundongos em nenhuma das concentrações de LPS utilizadas (0,1 a 100 ng/mL), sendo que a diferença de sensibilidade aos estímulos foi preservada (**Fig. 5**). A diferença entre camundongos BALB/c e C57BL/6 torna-se mais evidente com estímulos de 50 e 100 UI/mL de IFN- γ , tanto na ausência (**Fig. 4**) quanto na presença (**Fig. 5**) de LPS.

Produção de NO por neutrófilos peritoneais murinos após interação com promastigotas de *L. major*

Existe hoje um grande conhecimento sobre a interação de promastigotas de *L. major* com macrófagos de camundongos de linhagens resistentes e susceptíveis à infecção por este parasita. Entretanto, pouco se conhece sobre a resposta de neutrófilos após a interação com o parasita, embora estas estejam entre as primeiras células a entrar em contato com as promastigotas após sua inoculação pelo inseto vetor.

Para melhor conhecer a resposta de neutrófilos das duas linhagens de camundongo com promastigotas de *L. major*, investigamos a produção de óxido nítrico após a interação destas células com o parasita. Utilizamos 0,1 e 10 ng/mL de LPS em associação com 25 e 50 UI/mL de IFN- γ , pois nestas concentrações foi possível a detecção de respostas diferenciadas nos dois camundongos (**Fig. 5**).

Assim, quando neutrófilos murinos foram incubados com promastigotas de *L. major* na proporção de 10 parasitas por célula, durante 18 horas a 37°C, na presença de IFN- γ e LPS, observou-se inibição de cerca de 80% da produção de NO em neutrófilos de ambas as linhagens de camundongo com ambas as doses de IFN- γ utilizadas (**Fig. 6**).

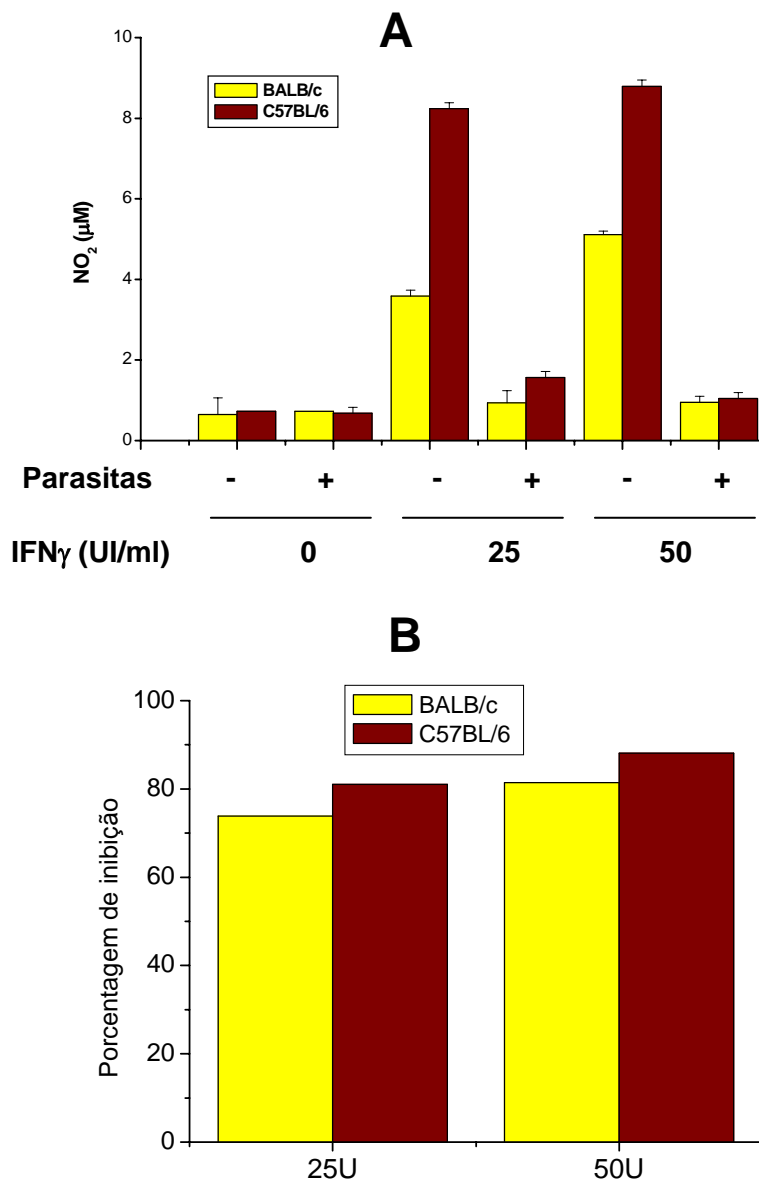


Figura 6. Inibição da produção de NO em neutrófilos murinos por promastigotas de *L. major*. Neutrófilos peritoneais ($1,5 \times 10^6$) foram cultivados a 37°C em meio RPMI 10% SFBi na presença de *L. major* na proporção 10:1 parasitas:célula, 10 ng/mL de LPS e 25 ou 50 UI/mL de IFN- γ por 18 h. A detecção de NO foi feita por coloração de Griess no sobrenadante da cultura, após centrifugação a 500 g. Experimento representativo de no mínimo outros três semelhantes. A) Produção de óxido nítrico detectada por coloração de Griess no sobrenadante. B) Porcentagem de inibição da produção de NO em neutrófilos na presença de *L. major*.

Investigamos em seguida a sensibilidade desta resposta de inibição na presença do parasita nas duas linhagens de camundongos. Neutrófilos de camundongos BALB/c e C57BL/6 foram, então, incubados com parasitas de fase estacionária nas proporções de 0,1, 1 e 10 parasitas/célula na presença de LPS e IFN- γ . Em ambas as linhagens de camundongos, observamos uma inibição dose-dependente, que se manifestou de forma mais eficaz nos neutrófilos de camundongos BALB/c. Na proporção de 0,1 parasita por célula não houve nenhuma inibição na produção de NO por neutrófilos das duas linhagens, nas concentrações de IFN- γ e LPS testadas.

No entanto, na proporção de 1 parasita por célula, os neutrófilos de camundongos BALB/c foram inibidos em cerca de 50% em sua capacidade de produzir NO, enquanto que esta proporção parasita:célula não foi suficiente para inibir a produção de NO em células de camundongos C57BL/6 (**Fig. 7**). De maneira geral a inibição em neutrófilos de C57BL/6 nesta proporção de parasitas:célula não ultrapassou 10%.

A proporção de 10 parasitas por célula provocou inibição de 85 +/- 15% na produção de NO em neutrófilos de camundongos BALB/c, e de 60 +/- 15% nas células de camundongos C57BL/6 (**Fig. 7**).

A inibição da produção de NO mediada pelos parasitas é um processo que requer a viabilidade dos parasitas, uma vez que a interação com parasitas mortos pelo calor (100°C por 5 minutos) nas proporções de 1:1 ou 10:1 parasitas:célula não provocou inibição ou provocou uma inibição desprezível, respectivamente, na produção de NO por neutrófilos das duas linhagens de camundongo (**Fig. 7**).

Expressão de iNOS em neutrófilos murinos

Nas células de defesa, como macrófagos e neutrófilos, a produção de NO depende da expressão da isoforma indutível da enzima óxido nítrico sintase, iNOS. Uma vez que detectamos uma produção diferenciada de NO por neutrófilos de camundongos das duas linhagens, resolvemos investigar se a diferença seria um reflexo da expressão diferenciada de iNOS nestas células após os estímulos utilizados. Além disso, investigamos também se a inibição da produção de NO após interação dos neutrófilos com promastigotas vivas de *L. major* seria devida à inibição da expressão da enzima iNOS.

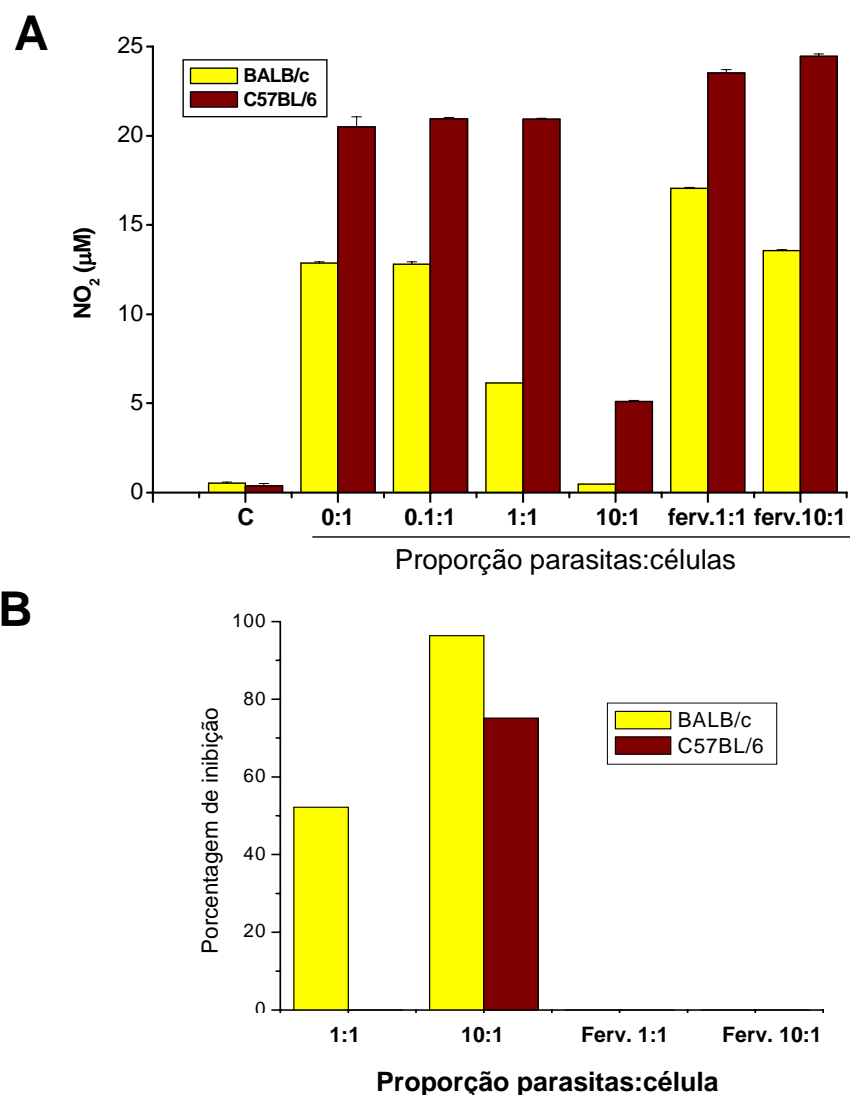


Figura 7. Inibição da produção de NO em neutrófilos murinos por *L. major* vivas ou mortas pelo calor na presença de 50 ng/mL de LPS e 50 UI/mL de IFN- γ . Neutrófilos peritoneais ($1,5 \times 10^6$) foram cultivados a 37°C em meio RPMI 10% SFBi na ausência e na presença de *L. major* viáveis ou mortas pelo calor em proporções variando de 0,1:1 a 10:1 parasitas:célula, na presença de 50 ng/mL de LPS e 50 UI/mL de IFN- γ . A detecção foi feita pela coloração de Griess no sobrenadante de neutrófilos incubados por 18 horas, após centrifugação a 500 g. Experimento representativo de outros três semelhantes. C: Controle de células sem estímulo de LPS e IFN- γ . A) Produção de óxido nítrico detectada por coloração de Griess no sobrenadante da cultura. B) Porcentagem de inibição da produção de NO pelos neutrófilos na presença de diferentes proporções de parasitas.

Assim, neutrófilos de ambas as linhagens de camundongos foram incubados na presença de 0,1 ng/mL de LPS e 50 UI/mL de IFN- γ por até 48 h e os lisados celulares foram utilizados para a pesquisa da iNOS por *Western blot* (**Fig. 8**).

Nossos resultados mostraram que, na ausência de estímulo, não há detecção da expressão de iNOS em neutrófilos de nenhuma das duas linhagens de camundongo mesmo após incubação por 24 h (**Fig. 8**). Com o estímulo utilizado, a expressão de iNOS, detectada como uma banda de peso molecular de 130 kDa, pode ser vista a partir de 8 horas de incubação em neutrófilos tanto de camundongos BALB/c como de camundongos C57BL/6. No entanto, a produção de iNOS por células de camundongos C57BL/6 pode ser observada mais precocemente, podendo ser identificada já a partir de 2 horas de incubação na presença de LPS e IFN- γ (**Fig. 8A**). A expressão da enzima é máxima com 16 horas de incubação, tanto para os neutrófilos de camundongos BALB/c como para os de C57BL/6, como observado na **Figura 8B**, que mostra uma diminuição na expressão da enzima após 24 e 48 h de incubação.

A detecção da enzima se inicia entre 2 e 4 h de incubação na presença do estímulo em neutrófilos de C57BL/6, e entre 6 e 8 h em BALB/c. É bastante claro que a expressão de iNOS é bem maior e mais persistente em neutrófilos de camundongos C57BL/6, podendo ser visualizada nessas condições por até 48 h após o estímulo, tempo em que neutrófilos de BALB/c já não mais expressam a enzima (**Fig. 8B**).

Uma vez conhecido o perfil de produção de iNOS após estímulo com LPS e IFN- γ por neutrófilos de camundongos susceptíveis e resistentes à infecção por *L. major*, avaliamos a expressão de iNOS nestas células após a interação com o parasita.

A análise da **figura 9** mostra que, nos neutrófilos das duas linhagens de camundongos, a interação com promastigotas vivas provoca uma diminuição dose-dependente na expressão da enzima iNOS. Esta inibição é mais pronunciada nas células de camundongos BALB/c, que apresentam uma redução dramática na expressão de iNOS, já na relação de 1 parasita por célula, e uma inibição completa quando utilizamos 10 parasitas por célula. Por outro lado, em neutrófilos de camundongos C57BL/6 a diminuição na expressão da enzima em decorrência da interação com promastigotas de *L. major* é menos pronunciada, mesmo na proporção de 10 parasitas para cada célula (**Fig. 9**).

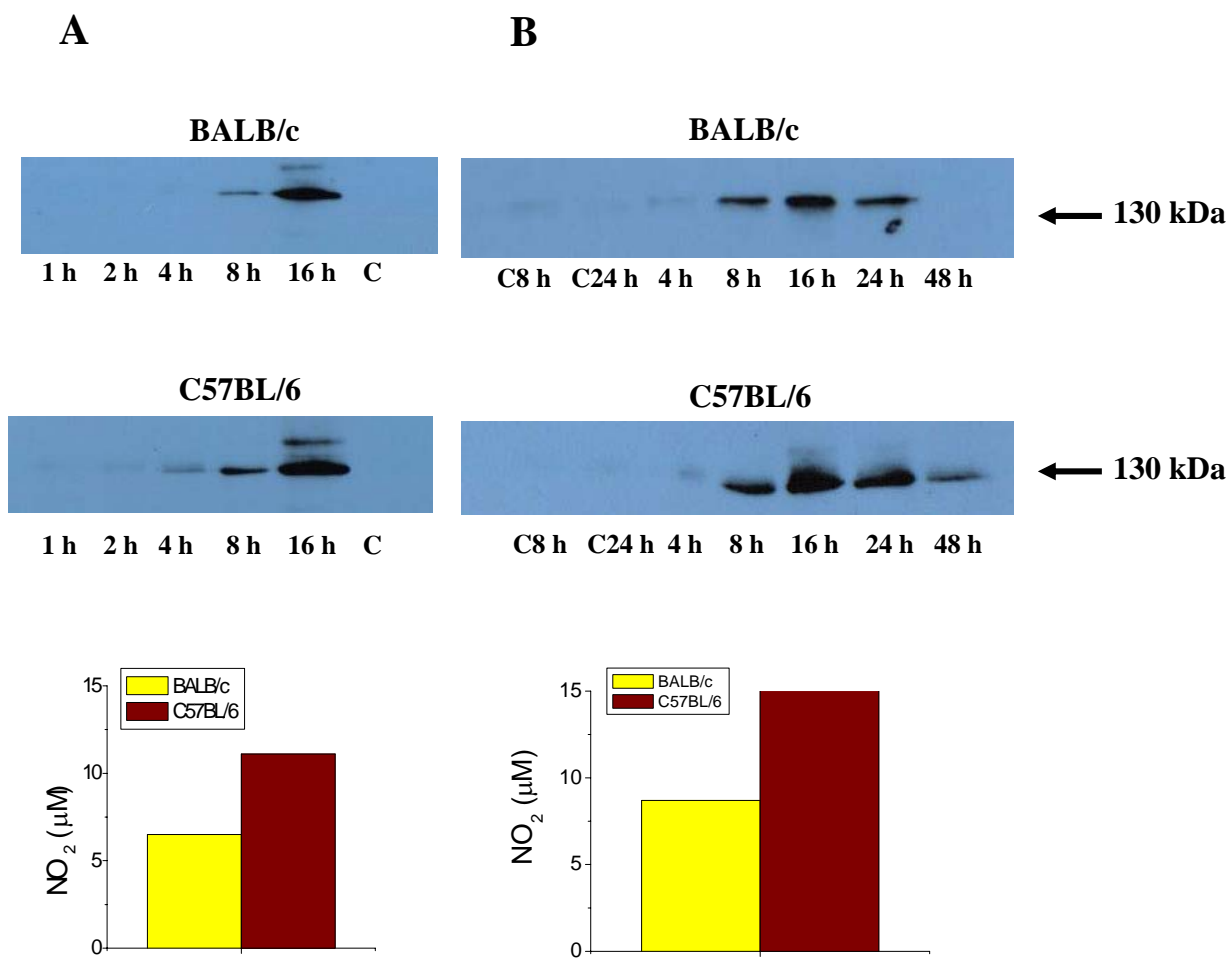


Figura 8. Expressão de iNOS em neutrófilos murinos na presença de LPS e IFN- γ .

Neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 ($1,5 \times 10^6$) foram incubadas em RPMI 10% SFBi a 37°C por 1 a 48 horas na presença de 0,1 ng/mL de LPS e 50 UI/mL de IFN- γ . A cada tempo as células foram recolhidas para extração e dosagem de proteínas. Foram fracionados 20 μ g (A) ou 30 μ g (B) de proteína de cada amostra em gel de poliacrilamida 7,5%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose posteriormente incubada com anticorpo anti-iNOS e revelada com ECL-Plus em filme para raio X. O controle consistiu de proteínas extraídas de células incubadas na ausência de estímulo com LPS e IFN- γ , durante 8 horas (C8 h), 16 h (C) ou 24 horas (C24 h). A quantidade de proteína aplicada foi avaliada visualmente quanto à equivalência entre todas as canaletas por coloração da membrana com Ponceau S 0,1% (dados não mostrados). Abaixo a produção de NO medida por Griess em cada experimento no período de 16 h.

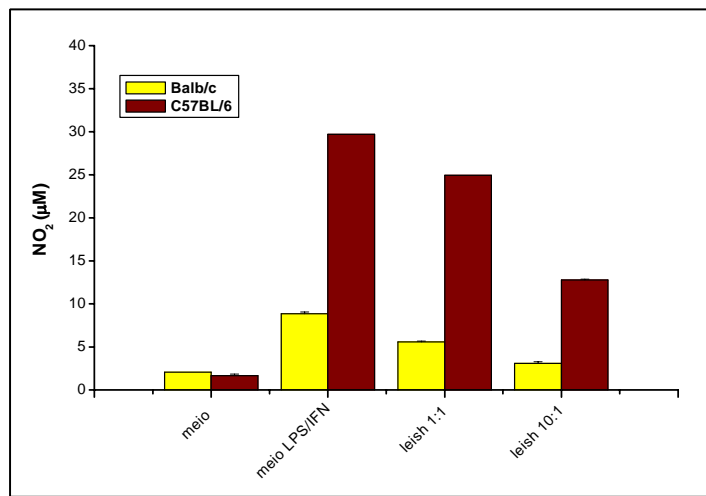
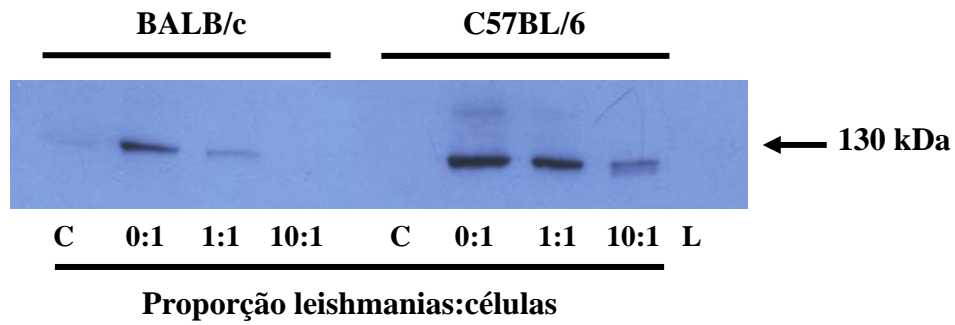


Figura 9. Expressão de iNOS induzida por LPS e IFN- γ em neutrófilos de BALB/c e C57BL/6 na presença de promastigotas de *L. major*. Neutrófilos de camundongos BALB/c e C57BL/6 ($1,5 \times 10^6$) foram incubados com 0,1 ng/mL de LPS e 50 UI/mL de IFN- γ , na presença ou ausência de promastigotas viáveis de *L. major* em diferentes proporções, por 18 h a 37°C. Foram fracionados 30 μ g de proteína de cada amostra, incluindo um controle com leishmanias apenas (incubadas na proporção de 10 vezes o número de neutrófilos das outras amostras) em gel de poliácridamida 7,5%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-iNOS. A membrana foi posteriormente revelada com ECL-Plus em filme para raio X. L: amostra de leishmanias sem neutrófilos. O controle (C) consistiu de células incubadas na ausência de estímulo com LPS e IFN- γ , durante 18 horas. Logo abaixo, coloração por Ponceau S 0,1% da membrana após transferência, para normatização da quantidade de proteína. Abaixo gráfico da produção de NO do mesmo experimento.

Explosão respiratória

A produção de intermediários reativos de oxigênio (IRO), chamada de explosão respiratória, é outro mecanismo importante utilizado por neutrófilos e outras células de defesa contra diversos patógenos. Neste trabalho, investigamos também a produção de IRO em neutrófilos de camundongos BALB/c e C57BL/6 após vários estímulos incluindo o IFN- γ , LPS e PMA.

Inicialmente, utilizamos PMA (*phorbol myristate acetate*), um ativador de proteína quinase C e potente estímulo para a explosão respiratória. A **figura 10** mostra que na ausência de PMA não há produção significativa de IRO em neutrófilos de nenhuma das duas linhagens. Na presença de PMA, neutrófilos de camundongos da linhagem BALB/c produzem uma quantidade 1,7 a 2,5 vezes maior de IRO que as células de camundongos da linhagem C57BL/6 (calculado pela área abaixo da curva, após descontados os valores do branco).

LPS e IFN- γ são dois importantes indutores da produção de óxido nítrico, mas pouco se sabe sobre sua ação na explosão respiratória em neutrófilos. Assim, utilizamos esses estímulos e avaliamos a produção de IRO nos neutrófilos. Verificamos que IFN- γ e LPS não provocam um aumento estatisticamente significativo ($p > 0,05$) em relação aos valores basais sem PMA (**Fig. 10**). Quando IFN- γ e LPS são adicionados juntamente com PMA, há um pequeno aumento ($22\% \pm 12\%$ em BALB/c e $30\% \pm 10\%$ em C57BL/6) na explosão respiratória (**Fig. 10**), mantendo-se a diferença entre as células das duas linhagens de camundongos, ou seja, em todas as condições houve maior produção em células de camundongos BALB/c. No entanto, se os neutrófilos são previamente incubados por 18 h na presença de IFN- γ e LPS, sua produção de IRO, ao contrário do experimento anterior, é bastante reduzida nas duas linhagens de camundongos ($45\% \pm 13\%$ em BALB/c e $55\% \pm 15\%$ em C57BL/6) (**Fig. 11**). A incubação apenas com IFN- γ e LPS não altera de forma significativa o comportamento dos neutrófilos em relação aos não tratados, sendo que a explosão respiratória fica bem próxima dos valores basais.

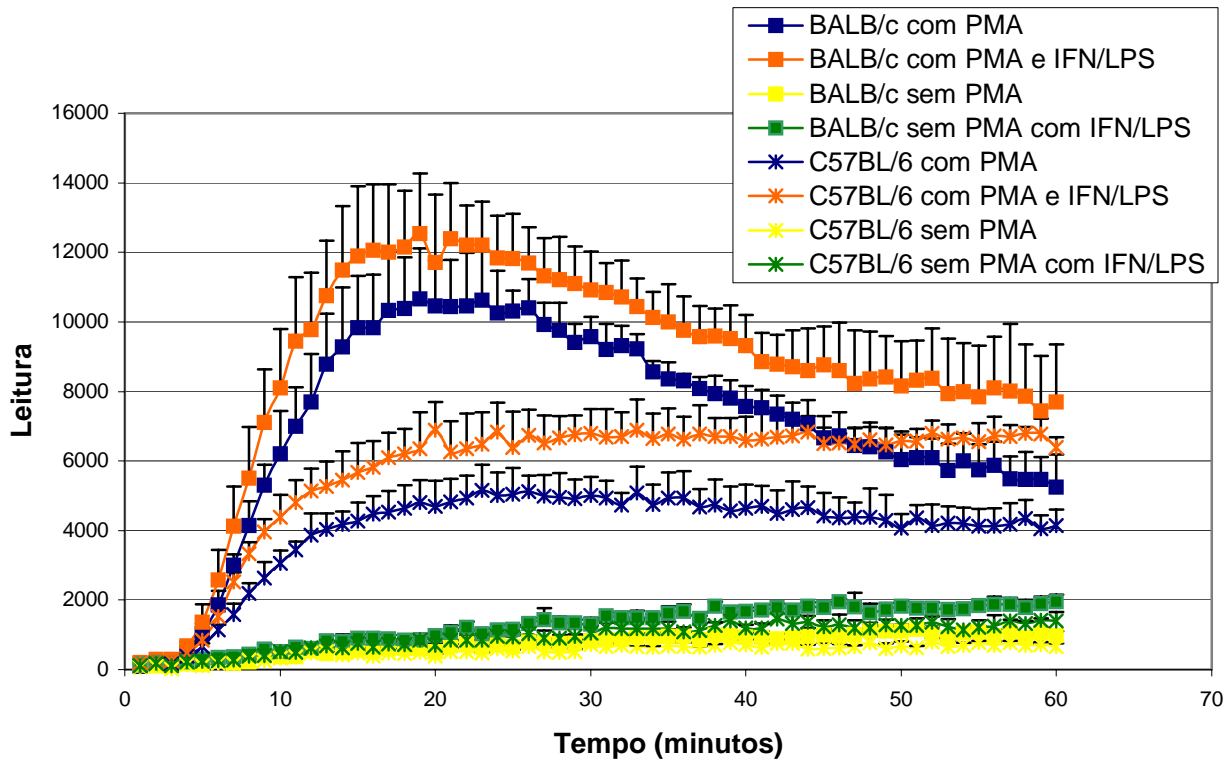


Figura 10. Explosão respiratória induzida por PMA em neutrófilos murinos na presença de LPS e IFN- γ . A explosão respiratória de neutrófilos de camundongos BALB/c () e C57BL/6 (*), na presença (linhas laranja e verde) ou ausência (linhas azul e amarela) de 0,1 ng/mL de LPS e 50 UI/mL de IFN- γ foi detectada em luminômetro após estímulo com PMA. As células foram estimuladas logo após o isolamento e a leitura foi feita em intervalos de 1 minuto durante 1 hora na presença de luminol. Experimento representativo de 3 semelhantes. Significância dos dados não paramétricos analisada por Mann-Whitney.

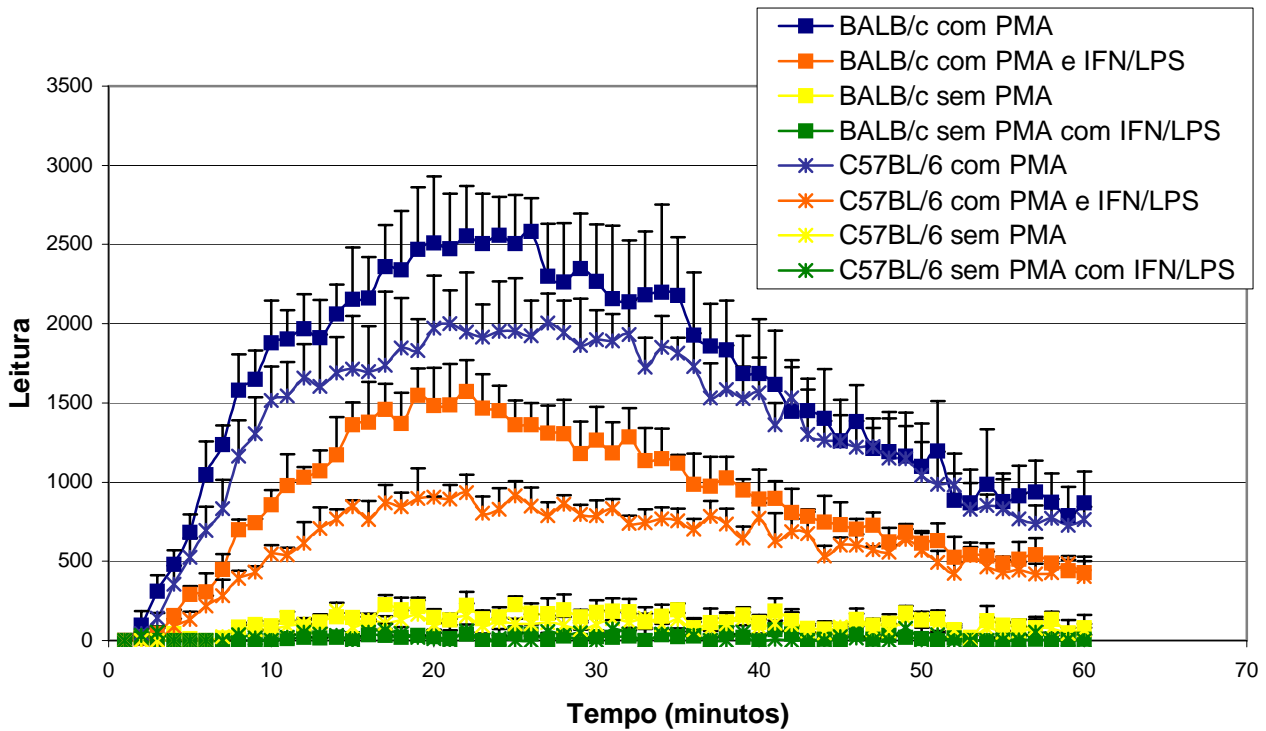


Figura 11. Explosão respiratória induzida por PMA em neutrófilos murinos previamente estimulados com LPS e IFN- γ . A explosão respiratória de neutrófilos de camundongos BALB/c () e C57BL/6 (*), na presença (linhas laranja e verde) ou ausência (linhas azul e amarela) de 0,1 ng/mL de LPS e 50 UI/mL de IFN- γ foi detectada em luminômetro após estímulo com PMA. As células foram estimuladas após 18 horas de incubação na presença de LPS e IFN- γ e a leitura foi feita em intervalos de 1 minuto durante 1 hora na presença de luminol. Experimento representativo de 3 semelhantes. Significância dos dados não paramétricos analisada por Mann-Whitney.

Explosão respiratória na presença de *L. major*

Uma vez que promastigotas de *L. major* se mostraram capazes de interferir na produção de NO por neutrófilos de camundongos BALB/c e C57BL/6, investigamos a seguir a geração da explosão respiratória nestas células após sua interação com o parasita. A **figura 12** mostra que, na presença de promastigotas de *L. major*, a explosão respiratória induzida por PMA é drasticamente inibida nas células das duas linhagens de camundongos. Entretanto, a redução da explosão induzida por PMA observada nos neutrófilos de

camundongos BALB/c ($70\% \pm 19\%$) é mais acentuada que nas células de C57BL/6 ($53\% \pm 11\%$). A inibição só ocorre, entretanto, se os parasitas forem adicionados antes do estímulo com PMA (dados não mostrados). Na ausência de PMA, a detecção de radicais de oxigênio nas células com parasitas foi semelhante ou levemente inferior à detecção nas células sem parasitas.

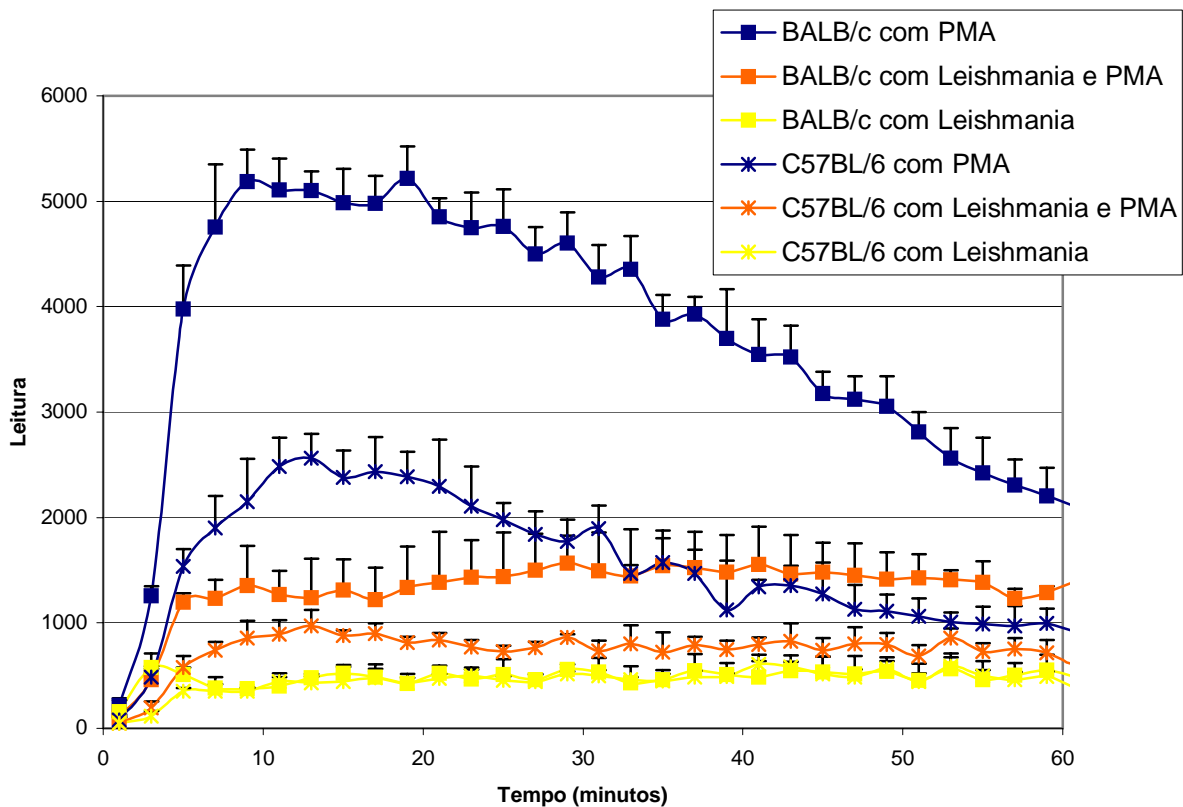


Figura 12. Explosão respiratória induzida por PMA em neutrófilos murinos na presença de *L. major*. A explosão respiratória de neutrófilos de camundongos BALB/c (■) e C57BL/6 (*), na presença (linhas laranja) ou ausência (linhas azuis) de promastigotas de *L. major* na proporção 10 parasitas:célula foi detectada em luminômetro após estímulo com PMA. A leitura foi feita em intervalos de 2 minutos durante 1 hora na presença de luminol. Experimento representativo de 3 semelhantes. Significância dos dados não paramétricos analisada por Mann-Whitney.

Avaliação da expressão e mobilização de proteínas componentes da NADPH oxidase em neutrófilos de camundongos BALB/c e C57BL/6

Uma vez que a geração da explosão respiratória mostrou diferenças acentuadas entre as duas linhagens de camundongo, analisamos a expressão de duas proteínas, p40*phox* e p47*phox*, em microscopia confocal, utilizando anticorpos específicos contra estas proteínas, na ausência e na presença de promastigotas de *L. major*. A proteína p40*phox* é um componente com funções reguladoras do restante do complexo da NADPH oxidase, e a proteína p47*phox* é um importante componente citosólico, sendo imprescindível a sua fosforilação para que se forme o complexo que se liga à membrana.

Avaliação do antígeno 7/4 como marcador de neutrófilos de camundongos BALB/c e C57BL/6

Para visualização e identificação dos neutrófilos obtidos para uso na microscopia confocal, em um primeiro momento, as células foram marcadas com o anticorpo RM6501, bastante citado na literatura, marcador do antígeno 7/4 de neutrófilos murinos, conjugado com FITC. As células marcadas foram analisadas em citometria de fluxo e microscopia confocal. Em nenhum dos experimentos realizados houve qualquer marcação de neutrófilos de camundongos BALB/c (**Fig. 13A e 14A**), mas houve marcação de cerca de 80% dos neutrófilos de camundongos C57BL/6 (**Fig. 13B e 14B**). Por análise de lâminas coradas com May-Grünwald-Giemsa e também pelo formato típico dos núcleos na microscopia confocal se comprovou que os cerca de 20% de células não marcadas em camundongos C57BL/6 também consistiam em neutrófilos. O anticorpo RM6501 não se mostrou desta forma um marcador eficiente de neutrófilos em nossas condições de isolamento e portanto não foi utilizado nos experimentos posteriores. A pureza das preparações foi testada periodicamente por lâminas coradas com May-Grünwald-Giemsa.

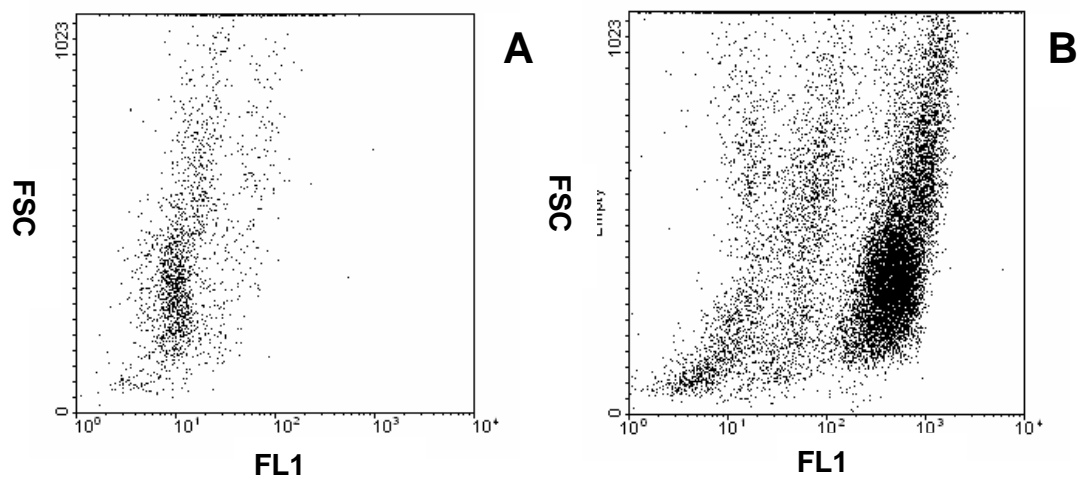


Figura 13. Gráfico de distribuição puntual para análise da marcação de neutrófilos murinos pelo anticorpo RM6501, contra o antígeno 7/4 de células polimorfonucleares. As células peritoneais de camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) foram isoladas conforme descrito em Material e Métodos e analisadas em citômetro FACScalibur após incubação com anticorpo RM6501. Nota-se que não houve marcação de neutrófilos de camundongos BALB/c (A), mas houve marcação de cerca de 80% dos neutrófilos de camundongos C57BL/6 (B).

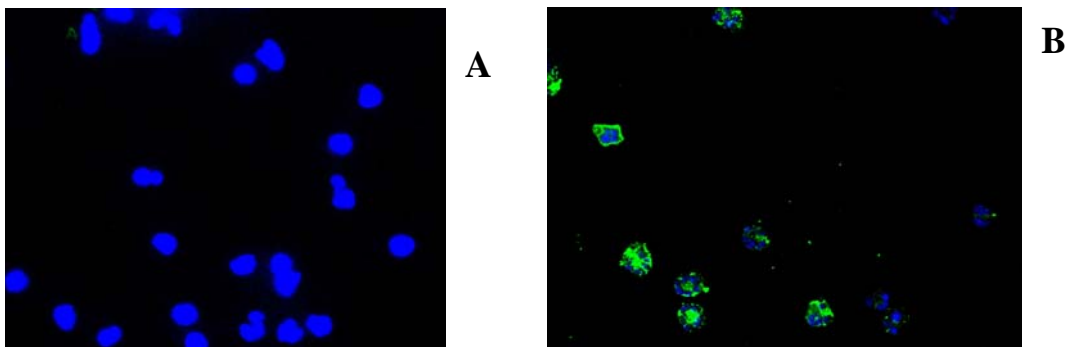


Figura 14. Microscopia confocal para análise de marcação de neutrófilos murinos pelo anticorpo RM6501, contra o antígeno 7/4 de células polimorfonucleares. Os neutrófilos foram purificados como descrito em Material e Métodos e cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi. As células foram incubadas com anticorpo RM6501 e a seguir com DAPI para marcação dos núcleos. Não foi detectada marcação de neutrófilos de camundongos BALB/c (A), mas houve marcação de cerca de 80% dos neutrófilos de camundongos C57BL/6 (B).

Expressão e mobilização da proteína p40*phox*

As **figuras 15** e **16** mostram que, na ausência de PMA, a proteína p40*phox*, que é um componente da NADPH oxidase com funções reguladoras do complexo, é pouco detectada (menos de 10% das células) em neutrófilos de camundongo BALB/c (**Fig. 15**), mas é detectada em 60% das células de camundongo C57BL/6 (**Fig. 16**). Após incubação com PMA durante 1 hora, a proteína p40*phox* continua não sendo detectada de forma marcante em BALB/c (**Fig. 17**), mas há um aumento da porcentagem de células que expressam a proteína (80%) em camundongos C57BL/6 (**Fig. 18**).

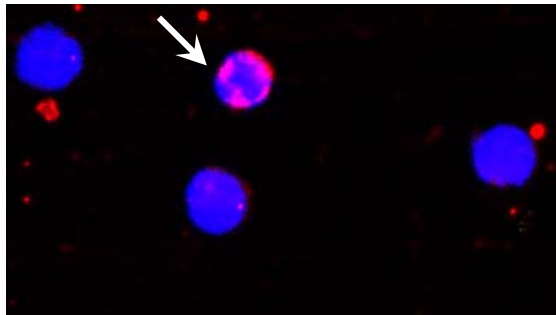


Figura 15. Detecção de p40*phox* em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na ausência de PMA. Os neutrófilos foram purificados como descrito e cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi. As células foram fixadas com formaldeído, permeabilizadas com saponina, incubadas com anticorpo anti-p40*phox* e a seguir com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. As setas indicam células positivas para p40*phox*.

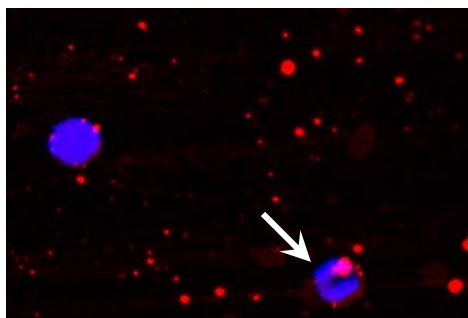


Figura 16. Detecção de p40*phox* em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na ausência de PMA. Os neutrófilos foram purificados como descrito e cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi. As células foram fixadas com formaldeído, permeabilizadas com saponina, incubadas com anticorpo anti-p40*phox* e a seguir com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. A seta indica uma célula positiva para p40*phox*.



Figura 17. Detecção de p40*phox* em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na presença de PMA. Os neutrófilos foram purificados como descrito e cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi na presença de 200 ng/mL de PMA. As células foram fixadas com formaldeído, permeabilizadas com saponina, incubadas com anticorpo anti-p40*phox* e a seguir com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. A seta indica uma célula positiva para p40*phox*.

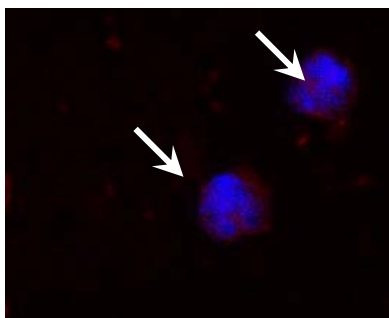


Figura 18. Detecção de p40*phox* em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na presença de PMA. Os neutrófilos foram purificados como descrito e cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi na presença de 200 ng/mL de PMA. As células foram fixadas com formaldeído, permeabilizadas com saponina, incubadas com anticorpo anti-p40*phox* e a seguir com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. As setas indicam células positivas para p40*phox*. Os quadros à direita mostram a mesma foto sem a marcação do núcleo para facilitar a visualização da marcação.

Expressão e mobilização da proteína p47*phox*

A **figura 19** mostra que, na ausência de PMA, a proteína p47*phox* é pouco detectada (menos de 5% das células) em neutrófilos de camundongo BALB/c. Em células de C57BL/6 houve detecção pronunciada em forma de anel, demonstrando uma localização concentrada na membrana (**Fig. 20**), em cerca de 20% das células analisadas. Após incubação com PMA durante 1 hora, a proteína p47*phox* foi detectada de forma marcante tanto em BALB/c (**Fig. 21**), em cerca de 90% das células analisadas, quanto em C57BL/6 (**Fig. 22**), em cerca de 70% das células.

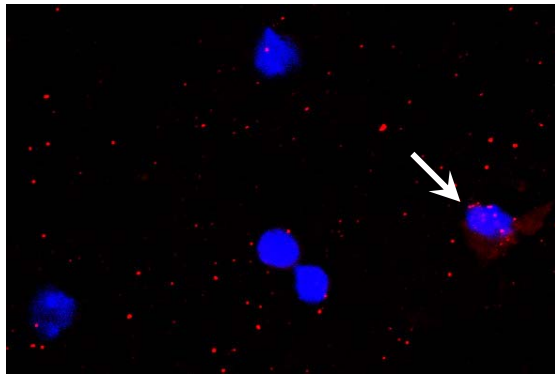


Figura 19. Detecção de p47phox em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na ausência de PMA. Os neutrófilos foram purificados como descrito e cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi. As células foram fixadas com formaldeído, permeabilizadas com saponina, incubadas com anticorpo anti-p47phox e a seguir com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. A seta indica uma célula positiva para p47phox.

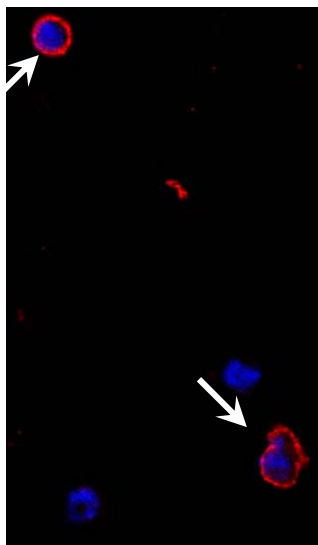


Figura 20. Detecção de p47phox em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na ausência de PMA. Os neutrófilos foram purificados como descrito e cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi. As células foram fixadas com formaldeído, permeabilizadas com saponina, incubadas com anticorpo anti-p47phox e a seguir com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. As setas indicam células positivas para p47phox.

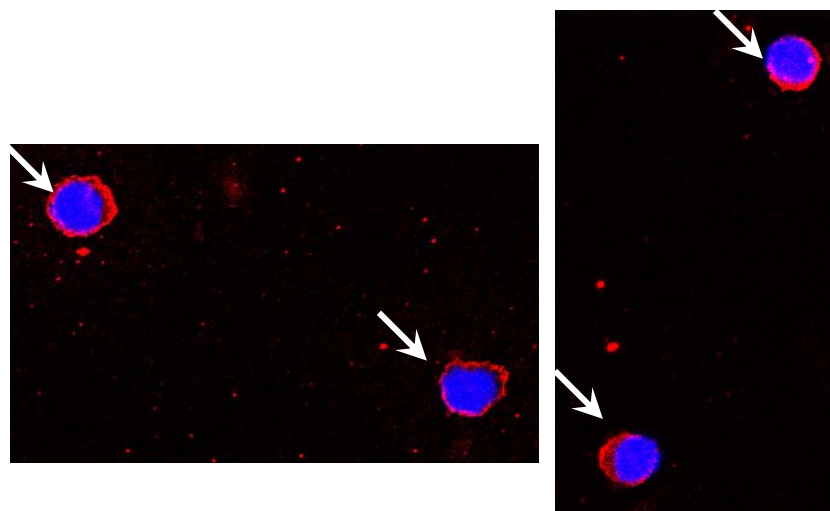


Figura 21. Detecção de p47phox em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na presença de PMA. Os neutrófilos foram purificados como descrito e cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi na presença de 200 ng/mL de PMA. As células foram fixadas com formaldeído, permeabilizadas com saponina, incubadas com anticorpo anti-p47phox e a seguir com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. As setas indicam células positivas para p47phox.

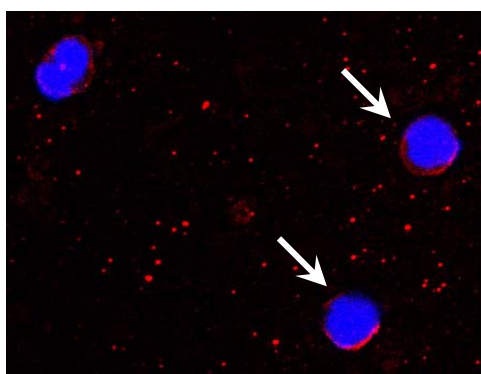


Figura 22. Detecção de p47phox em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na presença de PMA. Os neutrófilos foram purificados como descrito e cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi na presença de 200 ng/mL de PMA. As células foram fixadas com formaldeído, permeabilizadas com saponina, incubadas com anticorpo anti-p47phox e a seguir com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. As setas indicam células positivas para p47phox.

Avaliação da expressão e mobilização de proteínas componentes da NADPH oxidase na presença de *L. major*

Expressão e mobilização da proteína p40phox na presença de *L. major*

Na ausência do estímulo com PMA, há detecção de proteína p40phox em cerca de 30% das células de camundongos BALB/c que estão ligadas a promastigotas de *L. major* (**Fig. 23A**), enquanto nas outras células (não ligadas a parasitas) a proporção continua em 10% (**Fig. 23B**). As células de camundongos C57BL/6 apresentaram o mesmo padrão de detecção observado na ausência do parasita, com cerca de 50% (**Fig. 24**) de células marcadas fracamente.

Na presença de PMA, os neutrófilos de camundongos BALB/c não apresentaram detecção significativa de p40phox após a interação com os parasitas no tempo investigado (**Fig. 25**). Em C57BL/6 houve manutenção do mesmo padrão observado na ausência de PMA, na presença de *L. major* (**Fig 26**), com cerca de 50% das células marcadas fracamente. A **Tabela 1** resume a proporção de células positivas encontradas em cada uma das variáveis testadas para a proteína p40phox.

Expressão e mobilização da proteína p47phox na presença de *L. major*

Na presença de *L. major*, a proteína p47phox foi detectada em 30% das células de BALB/c sem o estímulo de PMA (**Fig. 27**). É interessante notar que a proteína está concentrada na membrana e há um acúmulo no ponto onde a promastigota é internalizada (**Fig. 27A**). Em C57BL/6, entretanto, há uma detecção pouco pronunciada de p47phox na presença de *L. major*, em menos de 10% das células, ligadas ou não a parasitas (**Fig. 28**).

Na presença de estímulo, enquanto em BALB/c há uma detecção pronunciada da proteína (60-70% das células) especialmente nas células que estão fagocitando leishmanias (**Fig. 29**), em C57BL/6 há uma marcante ausência de detecção desta proteína (**Fig. 30**).

A **Tabela 2** resume a proporção de células positivas encontradas em cada uma das variáveis testadas para a proteína p47phox.



Figura 23. Mobilização de p40*phox* em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na ausência de PMA e na presença de *L. major*. Neutrófilos peritoneais foram cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi na presença de promastigotas de *L. major* coradas em verde com CFSE e adicionadas na proporção 10:1 parasitas:células. Após incubação, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-p40*phox* e posteriormente com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. A foto mostra uma célula positiva para p40*phox* com leishmania aderida. Na foto da direita o DAPI foi apagado para melhor visualização da marcação.

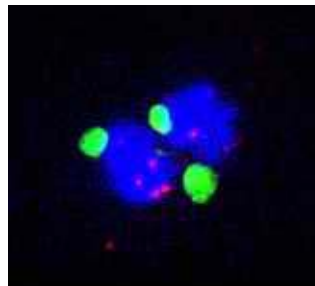


Figura 24. Mobilização de p40*phox* em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na ausência de PMA e na presença de *L. major*. Neutrófilos peritoneais foram cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi na presença de promastigotas de *L. major* coradas em verde com CFSE e adicionadas na proporção 10:1 parasitas:células. Após incubação, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-p40*phox* e posteriormente com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. Não há células consideradas positivas para p40*phox*.

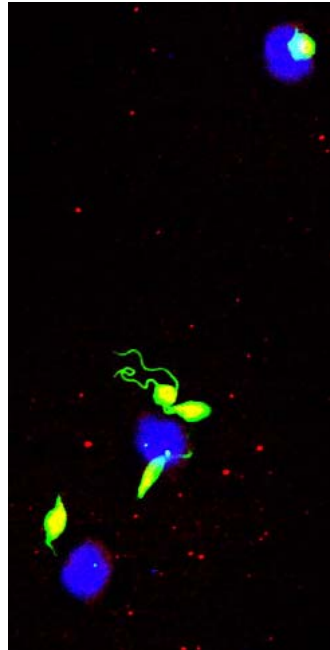


Figura 25. Mobilização de p40phox em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na presença de PMA e de *L. major*. Neutrófilos peritoneais foram cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBI com PMA na presença de promastigotas de *L. major* coradas em verde com CFSE e adicionadas na proporção 10:1 parasitas:células. Após incubação, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-p40phox e posteriormente com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. Não há células consideradas positivas para p40phox.

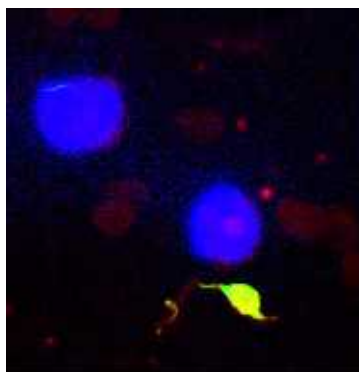


Figura 26. Mobilização de p40*phox* em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na presença de PMA e de *L. major*. Neutrófilos peritoneais foram cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi com PMA na presença de promastigotas de *L. major* coradas em verde com CFSE e adicionadas na proporção 10:1 parasitas:células. Após incubação, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-p40*phox* e posteriormente com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. Não há células consideradas positivas para p40*phox*.

Tabela 1. Porcentagem de células positivas para p40*phox* em neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 na presença e na ausência de PMA e/ou *L. major*

	BALB/c	C57BL/6
sem PMA	10% ± 5%	62% ± 22%
PMA	9% ± 6%	79% ± 18%
<i>L. major</i>	25% ± 9%	48% ± 15%
<i>L. major</i> e PMA	não significativo	52% ± 18%



Figura 27. Mobilização de p47 $phox$ em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na ausência de PMA e na presença de *L. major*. Neutrófilos peritoneais foram cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi na presença de promastigotas de *L. major* coradas em verde com CFSE e adicionadas na proporção 10:1 parasitas:células. Após incubação, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-p47 $phox$ e posteriormente com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. Todas as células mostradas estão positivas para p47 $phox$. A marcação foi detectada em forma de anel, demonstrando concentração na membrana, especialmente ao redor de leishmanias internalizadas. Na foto A, à direita, o DAPI foi apagado para melhor visualização da marcação.

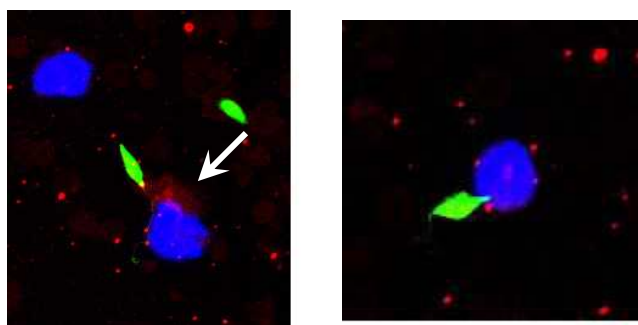


Figura 28. Mobilização de p47 $phox$ em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na ausência de PMA e na presença de *L. major*. Neutrófilos peritoneais foram cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi na presença de promastigotas de *L. major* coradas em verde com CFSE e adicionadas na proporção 10:1 parasitas:células. Após incubação, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-p47 $phox$ e posteriormente com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. Há poucas células marcadas, com ou sem leishmanias aderidas. A seta indica uma célula positiva para p47 $phox$.

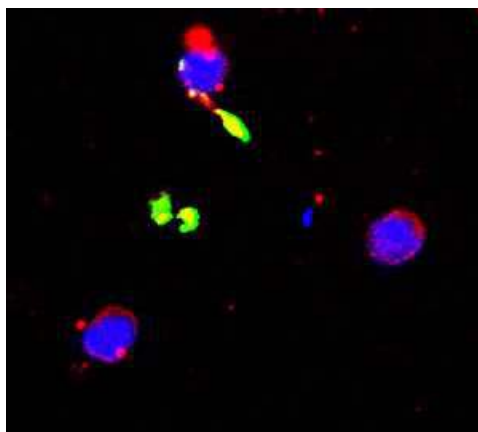


Figura 29. Mobilização de p47phox em neutrófilos peritoneais de camundongo BALB/c cultivados na presença de PMA e de *L. major*. Neutrófilos peritoneais foram cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi com PMA na presença de promastigotas de *L. major* coradas em verde com CFSE e adicionadas na proporção 10:1 parasitas:células. Após incubação, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-p47phox e posteriormente com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. Todas as células mostradas foram consideradas positivas para p47phox.

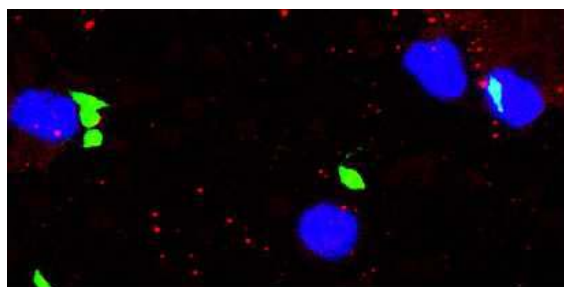


Figura 30. Mobilização de p47phox em neutrófilos peritoneais de camundongo C57BL/6 cultivados na presença de PMA e de *L. major*. Neutrófilos peritoneais foram cultivados por 1 hora em RPMI 10% SFBi com PMA na presença de promastigotas de *L. major* coradas em verde com CFSE e adicionadas na proporção 10:1 parasitas:células. Após incubação, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-p47phox e posteriormente com o anticorpo secundário marcado em vermelho com Cy-3. Os núcleos foram marcados em azul com DAPI. Nenhuma das células mostradas foi considerada positiva para p47phox.

Tabela 2. Porcentagem de células positivas para p47^{phox} em neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 na presença e na ausência de PMA e/ou *L. major*

	BALB/c	C57BL/6
sem PMA	5%	20% ± 8%
PMA	90% ± 9%	68% ± 21%
<i>L. major</i>	30% ± 9%	10% ± 5%
<i>L. major</i> e PMA	65% ± 7%	não significativo

DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma doença que envolve complexas interações parasita-hospedeiro, e o curso da patologia depende tanto da espécie de *Leishmania* quanto de características imunes do hospedeiro. O estudo destas complexas interações já revelou aspectos importantes para a compreensão de processos básicos da imunologia, como o direcionamento das células T CD4+ para Th1 e Th2 em camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente, na infecção com *L. major* (Reiner & Locksley, 1992; Alexander & Bryson, 2005; Olivier *et al.*, 2005).

Entretanto, a resistência ou susceptibilidade a uma determinada espécie de leishmania não está necessariamente associada ao desenvolvimento de respostas tipo Th1 ou Th2, e não são condições absolutas, havendo estágios intermediários (Afonso & Scott, 1993, McMahon-Pratt & Alexander, 2004). O balanço de moléculas microbidas, citocinas e quimiocinas produzidas em cada caso é um fator decisivo para a evolução da doença, e a complexidade de fatores envolvidos na produção de cada molécula em cada tipo celular necessita ainda, sem dúvida, de muitos estudos. Mais recentemente, vários estudos apontam ainda para a participação da imunidade inata na determinação do curso da leishmaniose (Aga *et al.*, 2002; Allenbach *et al.*, 2006; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; van Zandbergen *et al.*, 2004).

Embora a interação deste protozoário com neutrófilos seja menos investigada que sua interação com macrófagos, alguns trabalhos têm sugerido que eles possam ter papel importante na infecção, seja abrigando os parasitas vivos até a chegada dos macrófagos (Aga *et al.*, 2002; van Zandbergen *et al.*, 2004), seja inibindo a resposta dos macrófagos durante a infecção (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, demonstramos que neutrófilos de diferentes hospedeiros possuem respostas intrínsecas diferentes em relação ao mesmo estímulo, o que poderia se refletir na resposta diferencial das duas linhagens de camundongo à infecção com a espécie de *Leishmania* analisada. Foram encontradas respostas diferentes nas linhagens BALB/c e C57BL/6 quanto à produção de NO, expressão de iNOS, explosão respiratória e mobilização de componentes da NADPH oxidase.

Estudos realizados anteriormente mostraram diferenças significativas na participação de neutrófilos em infecções por *L. major* nas duas linhagens de camundongo

utilizadas em nosso estudo. Além do recrutamento diferencial, também a persistência no sítio de infecção é diferente para as duas linhagens (Beil *et al.*, 1992). Enquanto no camundongo C57BL/6, resistente à infecção, os neutrófilos permanecem por apenas 3 dias, no camundongo susceptível BALB/c estas células ainda são encontradas 10 dias após a infecção, em um processo extremamente relacionado aos macrófagos que são atraídos ao local para fagocitar as células apoptóticas. É interessante observar que a apoptose dos neutrófilos, que pode reduzir a ativação dos macrófagos que migram em seguida, é exacerbada pela presença de *L. major* (Allenbach *et al.*, 2006). Ribeiro-Gomes e colaboradores (2005), em um interessante trabalho onde neutrófilos dos camundongos C57BL/6 e BALB/c foram colocados em contato com macrófagos e sua própria linhagem e da outra linhagem, observou um papel protetor nos neutrófilos de C57BL/6 e um papel deletério, favorecendo a inibição de macrófagos de ambas as linhagens, para neutrófilos de camundongos BALB/c. Assim, estes dados sugerem que os neutrófilos das duas linhagens de camundongo possam ter características intrínsecas diferentes.

Charmoy e colaboradores (2007) detectaram diferenças em integrinas de superfície, receptores tipo Toll e produção de citocinas entre neutrófilos de camundongos BALB/c e C57BL/6 após a interação com *Leishmania major*.

Quando neutrófilos são depletados *in vivo* por anticorpos anti-neutrófilos, pode ocorrer até mesmo reversão do fenótipo Th2 em camundongos susceptíveis (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Entretanto, as variáveis envolvidas neste tipo de experimento podem fornecer resultados controversos, uma vez que Chen e colaboradores (2005) obtiveram aumento da lesão em camundongos susceptíveis cujos neutrófilos foram depletados, e pouca influência da depleção em camundongos C3H normalmente resistentes. Já o trabalho de Lima e colaboradores (1998) cita aumento do número de parasitas tanto no camundongo resistente (C57BL/6) depletado quanto no susceptível (BALB/c), sugerindo um papel protetor para os neutrófilos em ambas as linhagens.

A maioria dos estudos relativos à participação celular na leishmaniose concentra-se, entretanto, em linfócitos e em macrófagos, a célula hospedeira final, sendo que o modelo de infecção com *L. major* em camundongos C57BL/6 e BALB/c é bastante utilizado devido à clara polarização Th1/Th2 que resulta na resolução ou exacerbação da doença.

Macrófagos murinos produzem quantidades potencialmente microbicidas de NO, sendo muito superiores às quantidades produzidas por neutrófilos. Padgett & Pruet (1995) reportam que esta diferença é suficiente para que uma contaminação de macrófagos possa

influenciar resultados em preparações de neutrófilos. Assim, um dos passos determinantes em nossos experimentos foi obter uma preparação com alto grau de pureza de neutrófilos. Em preparações que não passaram por todas as etapas de purificação, foi detectado aumento da produção de NO entre 24 e 48 horas de cultivo (dados não mostrados). O passo de incubação das preparações de neutrófilos isolados por Ficoll-Hypaque em placas de Petri para retirada de células aderentes forneceu uma pureza compatível com detecção de NO por neutrófilos. Não foi detectado aumento da produção entre 24 e 48 horas de cultivo, o que é compatível com a meia-vida curta destas células e também com ausência de macrófagos contaminantes que sobreviveriam a este período de incubação. Mesmo com 40 minutos a mais de cultivo *in vitro* antes dos experimentos, a viabilidade dos neutrófilos foi relativamente alta (acima de 50%) após incubações de 16 a 18 horas (**Figura 3**).

Em nosso estudo, foi utilizado o método de Griess para a detecção de NO, por ser um método colorimétrico bastante utilizado que necessita apenas de espectrofotômetro para leitura. Apesar das modificações realizadas de acordo com Giustarini e colaboradores (2004) para aumentar a sensibilidade, o procedimento não foi suficiente para detectar, de forma confiável, concentrações abaixo de 1 μM nas análises de diluições sucessivas do padrão de NaNO_2 . Assim, os números obtidos com estímulo de LPS apenas, que ficaram próximos a estes valores (dados não mostrados), não foram considerados como valores significativos de produção de NO pelas células.

Embora alguns autores tenham verificado produção de NO por neutrófilos de camundongo e rato estimulados por LPS (Tavares-Murta *et al.*, 1997; Sethi *et al.*, 2001; Dikshit & Sharma, 2002), a metodologia utilizada nestes casos foi inoculação de LPS *in vivo* para determinação da produção *ex vivo*. É provável que a produção de NO nestes estudos não seja devida diretamente a um estímulo por LPS nos neutrófilos e sim por citocinas envolvidas na resposta de outras células ao LPS, hipótese sugerida a partir do fato que, em nossos estudos, não foi observada produção de NO por neutrófilos de camundongo após estímulo com LPS apenas, e a presença de LPS não provocou aumento significativo da produção de NO induzida por $\text{IFN-}\gamma$ (**Figuras 4 e 5**). Também em macrófagos a produção de NO parece estar sempre associada à presença de $\text{IFN-}\gamma$ (Gantt *et al.*, 2001).

Em nossa comparação entre a produção de NO por neutrófilos de ambas as linhagens de camundongo, foi detectada uma produção maior de NO por células de camundongos C57BL/6 em relação aos camundongos BALB/c nas concentrações de LPS e

IFN- γ testadas (**Figuras 4 e 5**). A produção aumentada no camundongo resistente correlaciona-se com aumento também da expressão de iNOS em relação ao camundongo susceptível (**Figura 8**).

Deve-se lembrar que o camundongo C57BL/6 apresenta resposta Th1 na infecção com *L. major*, ou seja, in vivo a produção de IFN- γ é muito mais pronunciada que em BALB/c. O estímulo para produção de NO pelos neutrófilos, portanto, estaria presente no camundongo C57BL/6 mas seria desprezível em BALB/c. Além disso, o próprio parasita, não estimula a produção de NO e ainda é capaz de inibir a produção estimulada por IFN- γ e LPS em ambos os camundongos (**Fig. 6 e 7**), mas dada a produção mais elevada de NO, em C57BL/6 a quantidade restante ainda poderia ser suficiente para inibir a replicação dos parasitas. As promastigotas inibem a produção de NO provavelmente por inibir a expressão de iNOS (**Fig. 9**), e esta inibição da enzima também é diferenciada nas duas linhagens de camundongos, sendo menos pronunciada em C57BL/6 mesmo quando adicionados 10 parasitas por célula. Este dado mostra que o parasita é capaz de interferir nas respostas microbicidas destas células podendo, assim, permanecer por mais tempo no interior das mesmas. Estes resultados podem dar suporte à hipótese de que o parasita se utiliza dos neutrófilos até a chegada de sua célula hospedeira final (van Zandbergen *et al.*, 2004). Entretanto, deve-se notar que mesmo após inibição, a produção de NO (**Figuras 6 e 7**) e a expressão de iNOS (**Figura 9**) são ainda detectáveis, permanecendo maiores no camundongo resistente. Estes dados podem indicar um papel dos neutrófilos no direcionamento de respostas protetoras ou não nas duas linhagens de camundongo.

A produção de NO e IRO é crítica para eliminação do parasita, mas o papel de cada uma destas moléculas pode ser mais ou menos preponderante. Camundongos resistentes podem ter maior susceptibilidade se nocauteados para iNOS (Wei *et al.*, 1995) ou para produção de IRO, mas o camundongo deficiente apenas em IRO eventualmente controla a infecção, demonstrando que NO pode ser mais importante que IRO na eliminação de algumas espécies de *Leishmania* como *L. major* (Gregory & Olivier, 2005) e *L. chagasi* (Gantt *et al.*, 2001). Este resultado está de acordo com nossas observações que indicam uma maior produção de NO no camundongo resistente a *L. major* (**Fig. 4 e 5**), enquanto o camundongo susceptível parece direcionar a produção de radicais tóxicos para os intermediários reativos de oxigênio. Em todas as variáveis testadas (com PMA e/ou IFN- γ

e LPS), a produção de IRO no camundongo susceptível BALB/c foi maior que no camundongo resistente C57BL/6 (**Fig. 10, 11 e 12**).

Deste modo, uma das características do camundongo C57BL/6 que o capacitam a eliminar *L. major* pode estar relacionada a uma maior produção de NO pelos neutrófilos, que, neste caso, não seriam utilizados como reservatórios do parasita vivo até a chegada do macrófago como sugerido por Laskay e colaboradores (2003). É interessante notar que esta maior produção de NO em camundongos C57BL/6 que nos camundongos BALB/c já foi detectada também nos macrófagos (Santos *et al.*, 2006).

Embora o parasita tenha desenvolvido uma capacidade de inibir a produção deste radical em neutrófilos, nossos resultados mostram que a inibição é mais pronunciada em camundongos BALB/c. Mesmo na proporção de 10 parasitas por célula, quando ocorre maior inibição, neutrófilos de camundongo C57BL/6 ainda produzem maior quantidade de NO que os de camundongo BALB/c (**Figuras 6 e 7**). A inibição é dependente da viabilidade do parasita, uma vez que parasitas mortos pelo calor não provocaram inibição em neutrófilos de nenhuma das duas linhagens (**Figuras 8 e 9**).

Embora neutrófilos de camundongos C57BL/6 apresentem maior produção intrínseca de NO que os de camundongos BALB/c, estes últimos produzem maior quantidade de IRO que os de camundongos C57BL/6, após ativação com PMA (**Figuras 13 a 15**). Embora também haja inibição da produção de IRO pelos parasitas vivos, a quantidade final ainda é maior em camundongos BALB/c (**Figura 15**). A inibição só ocorre, entretanto, se os parasitas forem adicionados antes do estímulo com PMA (dados não mostrados), indicando que neutrófilos previamente ativados adquirem capacidade de superar a inibição provocada por *L. major*. Uma maior produção de IRO, entretanto, não capacita o camundongo BALB/c a eliminar este parasita, sugerindo que *L. major* tenha maior resistência a IRO que a NO. A resistência de promastigotas de *Leishmania* spp. a NO pode ser determinante no curso da patologia (Santos *et al.*, 2006; Giudice *et al.*, 2007).

Em estudo com neutrófilos humanos, Laufs e colaboradores (2002) não observaram explosão respiratória em células infectadas com *L. major* na ausência de soro humano, embora na presença de soro 40% dos neutrófilos tenham respondido com produção de radicais de oxigênio à presença do parasita. Neste experimento, entretanto, não foi verificado se a explosão induzida por outro agente como PMA seria inibida pela presença do parasita. Em dados anteriores de nosso laboratório, mesmo após opsonização dos parasitas com soro murino, não foi observada produção significativa de IRO, e foi

observada inibição da produção de IRO induzida por PMA em neutrófilos (dados não mostrados), semelhante à observada na presença de parasitas não opsonizados (**Fig. 12**).

Outros autores (Al-Tuwaijri *et al.*, 1990; El-On *et al.*, 1990) demonstraram a inibição da explosão respiratória em neutrófilos humanos por *L. major*. Entretanto, a inibição pode ser dependente do hospedeiro, pois Mallinson e colaboradores (1989) encontraram um aumento da explosão respiratória provocado por promastigotas de *L. major* em neutrófilos de coelho. Estes autores reportam que na presença de *L. major*, a produção é maior do que com a adição de PMA apenas, de forma oposta aos dados obtidos no presente estudo para neutrófilos murinos (**Fig. 12**). Deve-se salientar entretanto que neutrófilos de coelho parecem apresentar resposta muito diferente dos neutrófilos de camundongo ao PMA, pois os resultados obtidos em nosso estudo demonstram uma produção muito mais alta nos camundongos em comparação aos resultados obtidos pelo autor em neutrófilos de coelho.

Em macrófagos, que são bastante estudados no modelo murino, esta inibição já foi detectada e deve-se em grande parte a um bloqueio da formação do complexo ativo da NADPH oxidase especificamente no fagolisossomo (Lodge *et al.*, 2006). A produção de IRO pela NADPH oxidase de membrana fora do fagolisossomo, entretanto, não é afetada, ou seja, o parasita pode até mesmo provocar a explosão respiratória sem ser afetado. Já foi demonstrado que, em monócitos humanos, o LPG purificado de *L. major* pode provocar explosão respiratória (Kavoosi *et al.*, 2006). Em neutrófilos humanos, esta mesma estratégia é utilizada por *Helicobacter pylori*, que faz com que a NADPH oxidase das células infectadas acumule-se na membrana plasmática e IRO seja liberado no meio extracelular, ao invés de ser criado no fagolisossomo. Como uma das diferenças importantes entre estes dois tipos celulares, deve-se lembrar que o fagolisossomo de neutrófilos amadurece em questão de minutos, diferentemente de macrófagos onde este amadurecimento é lento. Desta forma, a infecção com *H. pylori* causa uma grande explosão respiratória em neutrófilos mas esta não afeta o patógeno intracelular (Allen & McCaffrey, 2007). Em circunstâncias normais, IRO acumula-se no fagolisossomo e não no meio extracelular, onde causaria grande dano tecidual (Nauseef, 2004).

A estratégia utilizada por *Francisella tularensis* para escapar da explosão respiratória consiste em impedir a formação do complexo da NADPH oxidase, não provocando assim a produção de IRO em nenhum compartimento celular (Allen & McCaffrey, 2007). Este patógeno pode, desta forma, permanecer viável dentro de

neutrófilos (Allen & McCaffrey, 2007), havendo a possibilidade de se utilizarem destas células, da mesma forma que *Leishmania*, como cavalos de Tróia, como proposto por Laskay e colaboradores (2003).

A susceptibilidade à leishmaniose é dependente também da espécie de leishmania. Espécies mais susceptíveis à eliminação por IRO podem ser controladas em hospedeiros que são susceptíveis a outras espécies mais resistentes a IRO como *L. major*. *Leishmania chagasi* pode ser eliminada tanto por IRO quanto por NO, e não provoca inibição da produção de NO em macrófagos murinos (Gantt *et al.*, 2001). Por outro lado *L. guyanensis* parece ser sensível a IRO, já que macrófagos de BALB/c não ativados conseguem eliminar esta espécie sem produção de NO, mas com produção de IRO (Souza-Franco, 2001). Como a eliminação do parasita pode ser dependente da produção de um ou outro radical tóxico, é interessante observar que produção de NO ou IRO parece ser diferenciada entre linhagens de camundongo, como visto neste trabalho em neutrófilos de BALB/c e C57BL/6 (**Figs. 5, 4 e 10**), ou entre diferentes espécies de mamíferos, sendo interessante notar que macrófagos humanos não produzem NO em quantidades detectáveis na presença de alguns tipos de estímulos (Gantt *et al.*, 2001). Devido a este fato, a participação da produção de NO na evolução da leishmaniose humana é controversa, mas alguns autores salientam que macrófagos humanos são capazes de expressar iNOS funcional e produzir NO em resposta a várias doenças, entretanto, resultados conflitantes podem ser encontrados devido a diferentes fatores como estímulo inadequado, inibição pós-transcricional ou falta de cofatores, entre outros (Brandonisio *et al.*, 2001). Na presença de LPS e IFN- γ , Brandonisio e colaboradores (2001) obtiveram produção de NO em macrófagos humanos infectados com *L. infantum*, maior que em macrófagos não infectados.

Nossos experimentos contemplam o estudo *in vitro* da função celular nas duas linhagens de camundongos, o que significa que o número de células é igualado em cada experimento. Em relação ao papel dos neutrófilos na resolução de uma infecção por *Leishmania* spp., é provável que o número absoluto de células que migram em resposta à infecção possa ter influência na eliminação do parasita. A quantidade absoluta de NO liberado no local de infecção, por exemplo, pode alterar outras respostas inflamatórias como vasodilatação, devido ao seu papel imunomodulador. Já foi demonstrado que o infiltrado inflamatório é diferente em ambas as linhagens de camundongo (Beil *et al.*, 1992), o que pode se refletir na quantidade de parasitas internalizados por fagócitos e na produção total de moléculas sinalizadoras. É interessante notar que, embora sejam mais

abundantes no infiltrado inflamatório dos camundongos susceptíveis (Beil *et al.*, 1992), a depleção dos neutrófilos nos camundongos resistentes pode eliminar a capacidade de controlar a proliferação do parasita (Lima *et al.*, 1998). Em nossos estudos também confirmamos que a quantidade de neutrófilos obtida em camundongos BALB/c em resposta ao estímulo com tioglicolato foi sempre superior à obtida em camundongos C57BL/6 nas mesmas condições.

A presença de NO é moduladora para a produção de IRO em neutrófilos de rato (Dikshit & Sharma, 2002). Este fato pode estar refletido em nossos resultados que demonstram que a presença de IFN- γ e LPS, ativadores da produção de NO que possuem pouco efeito na indução da produção de IRO, causaram redução da produção de IRO em ambas as linhagens de camundongo (**Figura 12**). Também corroborando para uma diferenciação na produção de radicais tóxicos, Liew e colaboradores (1990) verificaram que há aumento da produção de peróxido de hidrogênio quando camundongos são tratados com inibidores de iNOS.

O anticorpo RM6501, marcador do antígeno 7/4, foi testado em nosso estudo como marcador de neutrófilos para as análises em microscopia confocal, mas este antígeno já foi encontrado sendo expresso também em monócitos recrutados por tioglicolato na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 (Henderson *et al.*, 2003). Os autores alertam que este anticorpo, comumente utilizado para depleção de neutrófilos, pode afetar os resultados dos estudos por depletar também uma subpopulação de monócitos igualmente recrutada nos primeiros momentos após um estímulo inflamatório. A descoberta desta população de monócitos reitera a necessidade de uma purificação mais específica das células recrutadas por tioglicolato em trabalhos que pretendam estudar as características de neutrófilos murinos. O fato deste anticorpo não ter marcado neutrófilos de camundongo BALB/c também reitera a necessidade de cuidado ao utilizá-lo em diferentes linhagens de camundongo.

A produção diferencial de IRO nas duas linhagens de camundongo pode ser resultante de vários fatores como diferenças na ativação da enzima, interação com proteínas inibidoras ou proporção diferencial de componentes da enzima. Verificamos que algumas das proteínas componentes da NADPH oxidase realmente se encontram em proporções diferentes nos dois camundongos.

Foi verificado que a proteína p40*phox*, cuja função é modular a ativação do complexo da NADPH oxidase, está presente sempre em maior número de células no

camundongo C57BL/6. Pouco ainda é conhecido sobre este componente, mas ele parece estabilizar o complexo entre p47phox e p67phox no citosol, além de facilitar o recrutamento para a membrana. A adição de p40phox em sistemas *cell-free* contendo os outros componentes da NADPH oxidase inibe a produção de IRO (Vergnaud *et al.*, 2000). Enquanto na ausência ou na presença de PMA, a detecção ocorreu em cerca de 10% de neutrófilos de camundongo BALB/c (**Fig. 15 e 17, e Tabela 1**), em C57BL/6 houve uma detecção de $62 \pm 22\%$ e $79 \pm 18\%$ (**Fig. 16 e 18, e Tabela 1**, diferença não significativa) na ausência e na presença de PMA, respectivamente. Na presença de promastigotas de *L. major* na proporção de 10 parasitas por célula, há um pequeno aumento na detecção da proteína em células de BALB/c. Embora não tenha sido estatisticamente significativo, é interessante notar que este aumento foi verificado apenas nas células que se encontravam com parasitas aderidos (**Fig. 23**). Na presença de promastigotas e de PMA, um estímulo para formação do complexo da NADPH oxidase, p40phox (potencialmente inibidora da atividade) não foi detectada de forma significativa (**Fig. 25**) em BALB/c mas foi encontrada em cerca de metade das células de C57BL/6 (**Fig. 26**), corroborando nossos resultados obtidos na explosão respiratória, que observamos ser maior em BALB/c.

A detecção da proteína p47phox, componente crítico da NADPH oxidase e iniciadora da cascata de complexação dos componentes citosólicos, também foi consistente com os dados da explosão respiratória. Na ausência de estímulo, embora tenha sido detectada em maior número de células em C57BL/6 ($20 \pm 8\%$, **Fig. 20**) que em BALB/c (cerca de 5%, **Fig. 19**), houve grande variação entre experimentos, e a situação se inverte na presença de PMA. O estímulo tem grande influência nas células de camundongos BALB/c, que passam de uma detecção pequena (em torno de 5%) para 90% de células com detecção pronunciada em forma de anel (**Fig. 21**), ou seja, concentrando-se na membrana, o que é esperado quando o complexo está formado. O estímulo também aumentou a detecção em células de C57BL/6, que chegou a mais de 70% (**Fig. 22**), mas deve-se lembrar de que neste camundongo a proteína p40phox também é encontrada em maior quantidade e pode reduzir a atividade do complexo. É interessante notar que a presença do parasita inibiu bastante a detecção da proteína p47phox em C57BL/6, encontrada de forma menos marcante que na ausência do parasita em cerca de 10% de células (**Fig. 28**). Inversamente, BALB/c apresentou aumento de detecção em relação a células sem parasitas, com cerca de 30% de células com a proteína bem definida na membrana, sendo inclusive bem notada ao redor dos pontos de interação com o parasita (**Fig. 27**). Mesmo

com estímulo de PMA, em C57BL/6 a presença da proteína foi detectada de forma pouco significativa (**Fig. 30**), sendo que em BALB/c ainda há uma detecção de cerca de 60-70% especialmente nos neutrófilos que estão ligados a parasitas (**Fig. 29**).

A proteína gp91*phox*, que se localiza na membrana, foi estudada na tentativa de verificar a quantidade do flavocitocromo presente nas duas linhagens de camundongo. O flavocitocromo é composto de duas subunidades, gp91*phox* e p22*phox*, na proporção de 1:1, sendo que gp91*phox* necessita da presença de p22*phox* para manter-se estável. A depleção de uma das proteínas automaticamente leva à ausência da outra (Roos *et al.*, 2003). Entretanto, a proteína não foi localizada em células de camundongos BALB/c nos experimentos realizados. Em C57BL/6, a proteína só foi localizada na presença de PMA, mas de forma inconspícua em cerca de 20% das células.

O processo de complexação, ativação e subsequente inativação da NADPH oxidase é contínuo após o estímulo inicial, sendo que a enzima é ativada em cerca de 1 minuto e permanece ativa por poucos minutos, ocorrendo a seguir a inativação e desligamento dos componentes, que voltam ao citoplasma até que ocorra nova fosforilação e montagem (DeCoursey & Ligeti, 2005). Desta forma ativação anterior pode esgotar os substratos disponíveis e reduzir a resposta dos neutrófilos durante o experimento, mas é provável que não cause diferença na quantidade dos componentes, que voltariam para o citoplasma em poucos minutos.

Detectamos, portanto, diferenças intrínsecas na produção de NO e IRO entre neutrófilos das duas linhagens de camundongos com diferentes respostas à infecção por *L. major*. Enquanto o camundongo resistente produz grande quantidade de NO em relação ao camundongo susceptível, em resposta ao estímulo de IFN- γ e LPS, este último produz maior quantidade de IRO em relação ao camundongo resistente, em resposta ao estímulo de PMA. A produção aumentada de IRO pode reduzir a produção de NO por sequestrar os substratos disponíveis (Bedard & Krause, 2007; Rubanyi & Vanhoutte, 1986), e pode haver ainda outras interações entre as duas cascatas como já sugerido por vários autores (Bedard & Krause, 2007; Carreras *et al.*, 1997), que pode ser o fator de influência nos resultados de produção de IRO quando foram utilizados estímulos para produção de IRO e NO concomitantemente (**Fig. 10 e 11**). Embora ambas as cascatas se utilizam de NADPH e O₂, a concentração de O₂ normalmente não é limitante para a formação de superóxido (DeCoursey & Ligeti, 2005) ou de NO. NADPH, entretanto, deve ser constantemente sintetizado durante a explosão respiratória, e pode haver competição por este substrato e

redução de um ou ambos os radicais tóxicos finais. Além disso, superóxido reage com NO para produzir peroxinitrito, podendo reduzir os níveis detectados tanto de NO quanto de IRO. Podem haver outros mecanismos envolvidos na interação entre as duas cascatas, como inativação de iNOS e outras enzimas importantes no processo de geração de NO por IRO.

Entretanto, no caso de neutrófilos, verificamos que a própria enzima responsável pela produção de NO tem sua expressão reduzida no camundongo susceptível. Além disso, as diferenças observadas nas proteínas responsáveis pela formação do complexo da NADPH oxidase também indicam que existem diferenças intrínsecas que estão em uma etapa anterior à produção dos radicais tóxicos, e podem ser determinantes para o curso da patologia da leishmaniose nas duas linhagens de camundongo utilizadas neste estudo.

Assim, nossos dados indicam que neutrófilos das duas linhagens de camundongo fornecem respostas diferentes aos mesmos estímulos, e que estas diferenças podem colaborar para o perfil diferenciado de resistência (no camundongo C57BL/6) e susceptibilidade (no camundongo BALB/c) à infecção com o protozoário *L. major*.

CONCLUSÕES

- Neutrófilos peritoneais de camundongos resistentes à infecção com *L. major* produzem 50 a 100% mais óxido nítrico que os neutrófilos de camundongos susceptíveis a este parasita, após estímulo de IFN- γ .
- A produção aumentada de NO está diretamente relacionada com a expressão aumentada da enzima iNOS em neutrófilos de camundongos resistentes.
- A interação com promastigotas de *L. major* reduz em média 80% a produção de NO em camundongos C57BL/6 e BALB/c, e esta inibição se reflete na expressão reduzida da enzima iNOS em ambas as linhagens de camundongo.
- Neutrófilos peritoneais de camundongos susceptíveis à infecção com *L. major* produzem em média o dobro de radicais de oxigênio que os neutrófilos de camundongos resistentes a este parasita, em resposta a estímulo com PMA.
- A interação com promastigotas de *L. major* reduz em 70% a produção de radicais de oxigênio em neutrófilos de camundongos BALB/c e em 50% a produção em neutrófilos de C57BL/6.
- A proteína p40*phox*, reguladora da formação do complexo da NADPH oxidase, é encontrada em proporções maiores nas células de camundongos C57BL/6 (50% ou mais dos neutrófilos) que de camundongos BALB/c (inferior a 10%), na presença ou na ausência de PMA e/ou promastigotas de *L. major*.
- A proteína p47*phox*, imprescindível para início da formação do complexo da NADPH oxidase, é encontrada em proporções maiores nas células de camundongos C57BL/6 (20% dos neutrófilos) que de camundongos BALB/c (cerca de 5%), na ausência de PMA, mas a proporção é alta em ambas as linhagens de camundongo na presença de PMA (90% em BALB/c e 70% em C57BL/6).
- A proteína p47*phox* é drasticamente reduzida em camundongos C57BL/6 na presença de promastigotas de *L. major*, com ou sem o estímulo de PMA. Em camundongos BALB/c, chega a aumentar de 5% para 30% na ausência de PMA, mas reduz de 90% para 60-70% na presença do estímulo de PMA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, L. C.; Scott, P. (1993). Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, **61** (7): 2952-2959.
- Aga, E.; Katschinski, D. M.; van Zandbergen, G.; Laufs, H.; Hansen, B.; Muller, K.; Solbach, W.; Laskay, T. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, **169** (2): 898-905.
- Alexander, J.; Bryson, K. (2005). T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, **99**:17-23.
- Allen, L-A. H.; McCaffrey, R. L. (2007). To activate or not to activate: distinct strategies used by *Helicobacter pylori* and *Francisella tularensis* to modulate the NADPH oxidase and survive in human neutrophils. **Immunological Reviews**, **219**: 103-117.
- Allenbach, C.; Zufferey, C.; Perez, C.; Launois, P.; Mueller, C.; Tacchini-Cottier, F. (2006). Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, **176** (11): 6656-6664.
- Al-Tuwaijri, A. S.; Al-Mofleh, I. A.; Mahmoud, A. A. (1990). Effect of *Leishmania major* on human polymorphonuclear leucocyte function *in vitro*. **Journal of Medical Microbiology**, **32**: 189-193.
- Amaral, V.; Pirmez, C.; Gonçalves, A.; Ferreira, G.; Grimaldi, G. (2000). Cell populations in lesions of cutaneous leishmaniasis of *Leishmania (L.) amazonensis*-infected rhesus macaques, *Macaca mulatta*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **95**: 209-216.
- Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, **30**: 1269-1281.

- Barral, A.; Petersen, E. A.; Sacks, D. L.; Neva, F. A. (1983). Late metastatic leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **32**: 277-285.
- Bedard, K.; Krause, K-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, **87**: 246-313.
- Beil, W. J.; Meinardus-Hager, G.; Neugebauer, D. C.; Sorg, C. (1992). Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **Journal of Leukocyte Biology**, **52**: 135-142.
- Ben-Salah, A.; Louzir, H.; Chlif, S.; Mokni, M.; Zaatour, A.; Raouene, M.; Ben-Ismaïl, R.; Dellagi, K. (2005). The predictive validity of naturally acquired Delayed-Type Hypersensitivity to leishmanin in resistance to *Leishmania major*-associated cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, **192**: 1981-1987.
- Bliss, S. K.; Gavrilescu, C.; Alcaraz, A.; Denkers, E. Y. (2001). Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. **Infection and Immunity**, **69** (8): 4898-4905.
- Bogdan, C.; Röllinghoff, M.; Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, **12**: 64-76.
- Brandonisio, O.; Panaro, M. A.; Sisto, M.; Acquafreda, A.; Fumarola, L.; Leogrande, D.; Mitolo, V. (2001). Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. **Parassitologia**, **4** (suppl.1): 1-6.
- Burg, N. D.; Pillinger, M. H. (2001). The neutrophil: Function and regulation in innate and humoral immunity. **Clinical Immunology**, **99** (1): 7-17.
- Carreras, M. C.; Riobo, N. A.; Pargament, G. A.; Boveris, A.; Poderoso, J. J. (1997). Effects of respiratory burst inhibitors on nitric oxide production by human neutrophils. **Free Radical Research**, **26**(4): 325-334.

- Cassatella, M. A. (1999). Production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *In*: Gabrilovich, D. I. (ed.). **The Neutrophils: New Outlook for Old Cells**. Imperial College Press, London. Chap. 5, pp. 151-230.
- Charmoy, M.; Megnekou, R.; Allenbach, C.; Zweifel, C.; Perez, C.; Monnat, K.; Breton, M.; Ronet, C.; Launois, P.; Tacchini-Cottier, F. (2007). *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. **Journal of Leukocyte Biology**, **82**:288-299.
- Chen, L.; Zhang, Z. H.; Watanabe, T.; Yamashita, T.; Kobayakawa, T.; Kaneko, A.; Fujiwara, H.; Sendo, F. (2005). The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mouse. **Parasitology International**, **54**: 109-118.
- DeCoursey, T. E.; Ligeti, E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **62**: 2173-2193.
- Desjeux, P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **95**: 239-243.
- Diefenbach, A.; Schindler, H.; Donhauser, N.; Lorenz, E.; Laskay, T.; MacMicking, J.; Röllinghoff, M.; Gresser, I.; Bogdan, C. (1998). Type 1 interferon (IFN α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, **8**: 77-87.
- Dikshit, M.; Sharma, P. (2002). Nitric oxide mediated modulation of free radical generation response in the rat polymorphonuclear leukocytes: a flowcytometric study. **Methods in Cell Science**, **24**: 69-76.
- Dutra, W. O.; Gollob, K. J.; Pinto-Dias, J. C.; Gazzinelli, G.; Correa-Oliveira, R.; Coffman, R. L.; Carvalho-Parra, J. F. (1997). Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, **45**: 74-80.

- El-On, J.; Zvillich, M.; Sarov, I. (1990). *Leishmania major*: inhibition of the chemiluminescent response of human polymorphonuclear leukocytes by promastigotes and their excreted factors. **Parasite Immunology**, **12**: 285-295.
- English, D. (1999). Molecular basis of neutrophil activation. *In*: Gabrilovich, D. I. (ed.). **The Neutrophils: New Outlook for Old Cells**. Imperial College Press, London. Chap. 1, pp. 1-29.
- Fonseca, S. G.; Romão, P. R.; Figueiredo, F.; Morais, R. H.; Lima, H. C.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q. (2003). TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, **33**(8): 2297-2306.
- Gantt, K. R.; Goldman, T. L.; McCormick, M. L.; Miller, M. A.; Jeronimo, S. M. B.; Nascimento, E. T.; Britigan, B. E.; Wilson, M. E. (2001). Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Immunology**, **167**: 893-901.
- Giudice, A.; Camada, I.; Leopoldo, P. T. G.; Pereira, J. M. B.; Riley, L. W.; Wilson, M. E.; Ho, J. L.; Jesus, A. R.; Carvalho, E. M.; Almeida, R. P. (2007). Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BioMedCentral Infectious Diseases**, **7**:7.
- Giustarini, D.; Dalle-Donne, I.; Colombo, R.; Milzani, A.; Rossi, R. (2004). Adaptation of the Griess reaction for detection of nitrite in human plasma. **Free Radical Research**, **38** (11): 1235-1240.
- Gomes, I. N.; Calabrich, A. F.; Tavares, R. S.; Wietzerbin, J.; de Freitas, L. A.; Veras, P. S. (2003). Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes and Infection**, **5** (4): 251-260.
- Gregory, D. J.; Olivier, M. (2005). Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, **130**: S27-S35.

- Handman, E. (2000). Cell biology of *Leishmania*. **Advances in Parasitology**, **44**: 1-39.
- Heinecke, J. W. (1999). The respiratory burst of neutrophils: oxidative pathways for the initiation of tissue damage at sites of inflammation. *In*: Gabrilovich, D. I. (ed.). **The Neutrophils: New Outlook for Old Cells**. Imperial College Press, London. Chap. 2, pp. 31-58.
- Heinzel, F. P.; Sadick, M. D.; Holaday, B. J.; Coffman, R. L.; Locksley, R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon- γ or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, **169**: 59-72.
- Henderson, R. B., Hobbs, J. A. R., Mathies, M., Hogg, N. (2003). Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. **Blood**, **102**: 328-335.
- Jankovic, D.; Sher, A.; Yap, G. (2001). Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. **Current Opinion in Immunology**, **13**: 403-409.
- Jones, D. E.; Elloso, M. M.; Scott, P. (1998). Host susceptibility factors to cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Bioscience**, **3**: 1171-1180.
- Kamhawi, S.; Ramalho-Ortigão, M., Pham, V. M., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., Barillas-Mury, C., Sacks, D. L., Valenzuela, J. G. (2004). A role for insect galectins in parasite survival. **Cell**, **119** (3): 329-341.
- Kavoosi, G.; Ardestani, S. K.; Kariminia, A.; Abolhassani, M.; Turco, S. J. (2006). *Leishmania major*: Reactive oxygen species and interferon gamma induction by soluble lipophosphoglycan of stationary phase promastigotes. **Experimental Parasitology**, **114**(4): 323-328.
- Kim. C.; Dinauer, M. C. (2006). Impaired NADPH oxidase activity in Rac2-deficient murine neutrophils does not result from defective translocation of p47*phox* and p67*phox* and can be rescued by exogenous arachidonic acid. **Journal of Leukocyte Biology**, **79**: 223-234.

- Lainson, R.; Shaw, J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. *In*: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. (eds). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine. Biology and Epidemiology.** Academic Press, London. Vol. 1, Chap. 1, pp. 1-120.
- Laskay, T.; van Zandbergen, G.; Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, **11** (5): 210-214.
- Laufs, H.; Müller, K.; Fleischer, J.; Reiling, N.; Jahnke, N.; Jensenius, J. C.; Solbach, W.; Laskay, T. (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, **70** (2): 826-835.
- Launois, P.; Louis, J. A.; Milton, G. (1997). The fate and persistence of *Leishmania major* in mice of different genetic backgrounds: an example of exploitation of the immune system by intracellular parasites. **Parasitology**, **115** (Suppl): S25-S32.
- Liew, F. Y.; Li, Y.; Millott, S. (1990). Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **The Journal of Immunology**, **145**: 4306-4310.
- Lima, G. M. A. C.; Vallochi, A. L.; Silva, U. R.; Bevilacqua, E. M. A. F.; Kiffer, M. M.; Abrahamsohn, I. A. (1998). The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunology Letters**, **64**: 145-151.
- Lodge, R.; Diallo, T. O.; Descoteaux, A. (2006). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. **Cellular Microbiology**, **8**(12): 1922-1931.
- Mallinson, D. J.; Lackie, J. M.; Coombs, G. H. (1989). The oxidative response of rabbit peritoneal neutrophils to leishmanias and other trypanosomatids. **International Journal for Parasitology**, **19** (6): 639-645.
- McMahon-Pratt, D.; Alexander, J. (2004). Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological Reviews**, **201**(1): 206-224.

- Metcalf, J. A.; Gallin, J. I.; Nauseef, W. M.; Root, R. K. (1986). **Laboratory Manual of Neutrophil Function**. Raven Press, New York. 191 p.
- Milon, G.; Del Giudice, G.; Louis, J. A. (1995). Immunology of Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Parasitology Today**, **11**: 244-247.
- Montes de Oca, R.; Buendía, A. J.; Del Río, L.; Sánchez, J.; Salinas, J.; Navarro, J. A. (2000). Polymorphonuclear neutrophils are necessary for the recruitment of CD8+ T cells in the liver in a pregnant mouse model of *Chlamydomydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. **Infection and Immunity**, **68** (3): 1746-1751.
- Müller, K.; van Zandbergen, G.; Hansen, B.; Laufs, H.; Jahnke, N.; Solbach, W.; Laskay, T. (2001). Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, **190**: 73-76.
- Murray, H. W.; Nathan, C. F. (1999). Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **Journal of Experimental Medicine**, **189**: 741-746.
- Nauseef, W. M. (2004). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. **Histochemical Cell Biology**, **122**: 277-291.
- Noda, T.; Amano, F. (1997). Differences in nitric oxide synthase activity in a macrophage-like cell line, RAW264.7 cells, treated with lipopolysaccharide (LPS) in the presence or absence of interferon- γ (IFN- γ): possible heterogeneity of iNOS activity. **Journal of Biochemistry**, **121**: 38-46.
- Oliveira, S. H. P.; Fonseca, S. G.; Romão, P. R. T.; Figueiredo, F.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q. (1998). Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. **Parasite Immunology**, **20**: 405-412.
- Olivier, M.; Gregory, D. J.; Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, **18** (2): 293-305.

- Oswald, I. P.; James, S. L. (1996). Nitrogen oxide in host defense against parasites. **Methods**, **10**: 8-14.
- Padgett, E. L.; Pruetz, S. B. (1995). Rat, mouse and human neutrophils stimulated by a variety of activating agents produce much less nitrite than rodent macrophages. **Immunology**, **84**(1): 135-141.
- Pearson, R. D.; Steigbigel, R. T. (1981). Phagocytosis and killing of *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leucocytes. **The Journal of Immunology**, **127**: 1438-1443.
- Pearson, R. D.; Uydess I. L.; Chapman, S. W.; Steigbigel, R. T. (1987). Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **81**: 735-739.
- Pedrosa, J.; Saunders, B. M.; Appelberg, R.; Orme, I. M.; Silva, M. T.; Cooper, A. M. (2000). Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **Infection and Immunity**, **68** (2): 577-583.
- Pimenta, P. F. P., dos Santos, M. A. V. & de Souza, W. (1987). Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils. **Journal of Submicroscopy Cytology**, **19**: 387-395.
- Pimenta, P. F. P., Modi, G. B., Pereira, S.T., Shahabuddin, M., Sacks, D. L. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. **Parasitology**, **115**: 359-369.
- Pimenta, P. F. P., Turco, S. J., McConville, M. J., Lawyer, P.G., Perkins, P. V., Sacks, D.L. (1992). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, **256**: 1812-1815.
- Pompeu, M. M. L.; Freitas, L. A. R.; Santos, M. L. V.; Kouri, M.; Barral-Netto, M. (1991). Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta Tropica**, **48**: 185-193.

- Reiner, S. L.; Locksley, R. M. (1992). Lessons from *Leishmania*: a model for investigations of CD4⁺ subset differentiation. **Infectious Agents and Disease**, **1**: 33-42.
- Remaley, A. T.; Kuhns, D. B.; Basford, R. E.; Glew, R. H.; Kaplan, S. S. (1984). Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O₂⁻ production. **The Journal of Biological Chemistry**, **259** (18): 11173-11175.
- Rest, F. R. (1988). Human neutrophil and mast cell proteases implicated in inflammation. **Methods in Enzymology**, **163**: 309-327.
- Ribeiro-Gomes, F. L.; Moniz-de-Souza, M. C. A.; Borges, V. M.; Nunes, M. P.; Mantuano-Barradas, M.; D'Ávila, H.; Bozza, P. T.; DosReis, G. (2005). Turnover of neutrophils mediated by Fas Ligand drives *Leishmania major* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, **192**: 1127-1134.
- Rogers, K. A.; DeKrey, G. K.; Mbow, M. L.; Gillespie, R. D.; Brodskyn, C. I.; Titus, R. G. (2002). Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, **209**: 1-7.
- Romani, L.; Mencacci, A.; Cenci, E.; Del Sero, G.; Bistoni, F.; Puccetti, P. (1997). An immunomodulatory role for neutrophils in CD4⁺ T helper subset selection in mice with candidiasis. **The Journal of Immunology**, **158**: 2356-2362.
- Roos, D.; van Bruggen, R.; Meischl, C. (2003). Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes and Infection**, **5**: 1307-1315.
- Rousseau, D.; Demartino, S.; Ferrua, B.; Michiels, J. F.; Anjuere, F.; Fragaki, K.; Le Fichoux, Y.; Kubar, J. (2001). *In vivo* involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiology**, **1**: 17.
- Rubanyi, G.M.; Vanhoutte, P.M. (1986). Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **American Journal of Physiology**, **250**: H822–H827.

- Sacks, D. L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, **69**: 100-103.
- Santos, J. L.; Andrade, A. A.; Dias, A. A. M.; Bonjardim, C. A.; Teixeira, S. M. R.; Reis, L. F. L.; Horta, M. F. M. (2006). Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN-gamma/LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, **26**(9): 682-688.
- Santos, L. V.; Pompeu, M. M. I.; Kouri, M.; Freitas, L. A. R.; Barral-Netto, M. (1988). Role of granulocytes in the infection of BALB/c mice by *Leishmania mexicana amazonensis*. Ultrastructural analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **83**: 37.
- Segal, A. W. (2005). How neutrophils kill microbes. **Annual Reviews of Immunology**, **23**: 197-223.
- Sethi, S.; Sharma, P.; Dikshit, M. (2001). Nitric oxide- and oxygen-derived free radical generation from control and lipopolysaccharide-treated rat polymorphonuclear leukocyte. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, **5** (5): 482-493.
- Singh, S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, **123**: 311-330.
- Sisto, M.; Brandonisio, O.; Panaro, M. A.; Acquafredda, A.; Leogrande, D.; Fasanella, A.; Trotta, T.; Fumarola, L.; Mitolo, V. (2001). Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, **24**: 247-254.
- Solbach, W.; Laskay, T. (2000). The host response to *Leishmania* infection. **Advances in Immunology**, **74**: 275-317.
- Souza-Franco, J. (2001). **Estudo de mecanismos de eliminação de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis* por macrófagos murinos**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

- Stenger, S.; Thuring, H.; Rollinghoff, M.; Bogdan, C. (1989). Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **Experimental Parasitology**, **68**: 369-372.
- Sunderkötter, C.; Kunz, M.; Steinbrink, K.; Meinardus-Hager, G.; Goebeler, M.; Bildau, H.; Sorg, C. (1993). Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Immunology**, **151**: 4891-4901.
- Tateda, K.; Moore, T. A.; Newstead, M. W.; Tsai, W. C.; Zeng, X.; Deng, J. C.; Chen, G.; Reddy, R.; Yamaguchi, K.; Standiford, T. J. (2001). Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of *Legionella* pneumonia: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. **Infection and Immunity**, **69** (4): 2017-2024.
- Tacchini-Cottier, F.; Zweifel, C.; Belkaid, Y.; Mukankundiye, C.; Vasei, M.; Launois, P.; Milon, G.; Louis, J. A. (2000). An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, **165**: 2628-2636.
- Tavares-Murta, B. M.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. (1996). Differential production of nitric oxide by endotoxin-stimulated rat and mouse neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **29** (3): 381-388.
- van Zandbergen, G.; Hermann, N.; Laufs, H.; Solbach, W.; Laskay, T. (2002). *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infection and Immunity**, **70** (8): 4177-4184.
- van Zandbergen, G.; Klinger, M.; Mueller, A.; Dannenberg, S.; Gebert, A.; Solbach, W.; Laskay, T. (2004). Cutting Edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for leishmania entry into macrophages. **The Journal of Immunology**, **173**: 6521-6525.
- Vergnaud, S.; Paclet, M. H.; Benna, J. E.; Pocardalo, M. A.; Morel, F. (2000). Complementation of NADPH oxidase in p67-phox-deficient CGD patients. p67-phox/p40-phox interaction. **European Journal of Biochemistry**, **267**: 1059-1067.

- Virella, G. (1999). Diagnostic evaluation of neutrophil function. *In: Gabrilovich, D. I. (ed.). **The Neutrophils: New Outlook for Old Cells***. Imperial College Press, London. Chap. 8, pp. 275-298.
- Webb, J. L.; Polak, J. M.; Evans, T. J. (2001). Effect of adhesion on inducible nitric oxide synthase (iNOS) production in purified human neutrophils. **Clinical and Experimental Immunology**, **123**: 42-48.
- 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. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, **375**: 408-411.
- WHO (World Health Organization). <http://www.who.int/>
- Wilson, M. E.; Pearson, R. D. (1990). Immunology of leishmaniasis. *In: Wyler, D. J. (ed.) **Modern Parasite Biology***. W. H. Freeman and Company, New York. Chap. 11, pp. 200-221.
- Witko-Sarsat, V.; Rieu, P.; Descamps-Latscha, B.; Lesavre, P.; Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory Investigation**, **80** (5): 617-653.