

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR**

Otoni Alves de Oliveira Melo Júnior

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS EM  
NEUTRÓFILOS CULTIVADOS *IN VITRO* COM FORMAS PROMASTIGOTAS  
DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* OU *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

Belo Horizonte

2015

Otoni Alves de Oliveira Melo Júnior

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS EM  
NEUTRÓFILOS CULTIVADOS *IN VITRO* COM FORMAS PROMASTIGOTAS  
DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS* OU *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro  
Giunchetti

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Denise da Silveira  
Lemos

Belo Horizonte

2015

043

Melo Júnior, Otoni Alves de Oliveira.

Avaliação do efeito de receptores purinérgicos em neutrófilos cultivados in vitro com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* [manuscrito] / Otoni Alves de Oliveira Melo Júnior. – 2015.

90 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti. Co-orientadora: Dra. Denise da Silveira Lemos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. *Leishmania*. 3. Receptores Purinérgicos. 4. Neutrófilos. 5. resposta imune. I. Giunchetti, Rodolfo Cordeiro. II. Giunchetti, Denise da Silveira Lemos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE**

**OTONI ALVES DE OLIVEIRA MELO JÚNIOR**

167/2015  
entrada  
2º/2013  
2013716723

Às **quatorze horas** do dia **30 de julho de 2015**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE RECEPTORES PURINÉRGICOS EM NEUTRÓFILO CULTIVADOS IN VITRO COM FORMAS PROMASTIGOTAS DE LEISHMANIA AMAZONENSIS OU LEISHMANIA BRAZILIENSIS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

| Prof./Pesq.                              | Instituição                               | Indicação |
|--|---|-----------|
| Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti          | UFMG                                      | Aprovado  |
| Dra. Denise da Silveira Lemos Giunchetti | FIOCRUZ                                   | Aprovado  |
| Dr. Kenneth John Gollob                  | Instituto de Ensino e Pesquisa Santa Casa | Aprovado  |
| Dr. Gustavo Batista de Menezes           | UFMG                                      | Aprovado  |

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 30 de julho de 2015.**

Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (Orientador) R. Cordeiro

Dra. Denise da Silveira Lemos Giunchetti Denise da Silveira Lemos Giunchetti

Dr. Kenneth John Gollob Kenneth John Gollob

Dr. Gustavo Batista de Menezes Gustavo Batista de Menezes

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Luciana de Oliveira Andrade  
Prof.ª Luciana de Oliveira Andrade  
Sub-Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular UCB / UFMG

Dedico esse trabalho aos meus pais, que sempre batalharam com muita dificuldade e que fizeram o possível e o impossível para me oferecer uma boa educação. Que acreditaram em mim e apoiaram meu gosto pelo estudo. O esforço de vocês sempre foi a minha motivação. Serei eternamente grato pela oportunidade de vida e pela confiança. Espero, através dessa conquista, retribuir um pouco do que fizeram por mim.

## AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, principalmente aos meus pais, por todo amor, dedicação integral e eterna paixão. Meus heróis e espelhos, tudo que eu faço é para vocês, e por vocês. Palavras não são o suficiente para descrever todo o sentimento.

À Marina, pela cumplicidade e carinho incondicional. Pela dedicação ao meu projeto como se fosse o seu. Nossa relação é uma verdadeira benção. Em sua companhia, até as horas intermináveis de análises se tornaram mais leves e agradáveis. Obrigado pela parceria de vida e de trabalho. Aproveito esse momento, para parafrasear Led “If the sun refused to shine, I would still be loving you, When mountains crumble to the sea, There'll still be you and me”, Thank you.

Aos meus orientadores Rodolfo e Denise, por terem me recebido tão gentilmente como aluno e pela confiança que me foi dada. Pela oportunidade de trabalhar com algo diferente e atrativo. Pelo exemplo e experiência profissional.

Ao Maurício, pela grande amizade, pela grande contribuição ao projeto e pela dedicação, desde o meu primeiro dia de laboratório. E claro, pela “paciência”.

A todos do LaBIC, principalmente ao Maurício, pela amizade e pela grande contribuição ao projeto, desde o meu primeiro dia de laboratório.

Ao Professor Luís Afonso e a Amanda Figueiredo pela importante contribuição material e experimental.

Aos professores e colegas do LBIC, pela recepção calorosa e convivência agradável e divertida.

Aos meus eternos amigos Pedro, Felipe, Leonardo, Gustavo e Rafael, pelas inúmeras horas de descontração, paciência e compreensão, amizade sincera, meus irmãos de outros pais.

A todos os C57BL/6 pela doação, mesmo que não voluntariosa, dos neutrófilos.

Às Leishmanias, mesmo causando doença, e as vezes não querendo crescer, sem elas não haveria meus estímulos.

Ao Led Zeppelin, Pink Floyd, Queen, Beatles, Guns N' Roses, Elvis Presley, Frank Sinatra, Dean Martin entre outros, que mesmo de modo involuntário contribuíram nos momentos de tensão e descontração.

Se eu tivesse que escolher um entre todos os sentimentos, certamente escolheria a gratidão. Não há nada mais bonito do que uma pessoa grata. Eu considero como uma virtude das mais nobres. Para mim, a gratidão é o amor que reconhece a importância de atos e palavras proferidas por pessoas especiais. É o delicado conforto de ter sido auxiliado. É o meu eterno e sincero “obrigado”.

“...Tired of lying in the sunshine  
Staying home to watch the rain  
You are young, and life is long  
And there is time to kill today  
And then one day, you find  
Ten years have got behind you  
No one told you when to run  
You missed the starting gun...

...Every year is getting shorter  
Never seem to find the time  
Plans that either come to naught  
Or half a page of scribbled lines  
Hanging on in quiet desperation is the english way  
The time has gone, the song is over  
Thought I'd something more to say...”

Waters, Gilmour, Manson & Wright  
(1974)



## RESUMO

A presença do ATP, no meio extracelular, pode ser interpretada como um “sinal de perigo” por neutrófilos, sendo seus efeitos, dependentes de fatores, como da ação de enzimas ectonucleosídeo 5'-trifosfato difosfohidrolase - E-NTPDase (CD39) e 5' nucleotidase (CD73), além dos receptores purinérgicos de ATP. O presente estudo avaliou a participação dos receptores purinérgicos na resposta imune de neutrófilos estimulados *in vitro*, com *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*. As análises iniciais de viabilidade de neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* demonstraram que o percentual de células viáveis não foi alterado. Foi observado maior percentual de interação de *L. braziliensis* com neutrófilos quando comparados a *L. amazonensis*. Embora a análise da frequência de neutrófilos expressando CD39 e CD73 tenha sido semelhante, independente do estímulo, apenas a cultura estimulada com *L. amazonensis* apresentou aumento da expressão de CD73. De forma semelhante, esse resultado refletiu na análise da atividade enzimática de CD73 em degradar AMP, apresentando-se aumentada quando os neutrófilos foram estimulados com *L. amazonensis*. Assim, haveria um aumento de adenosina, que poderia contribuir para um microambiente menos pró-inflamatório durante a infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos, ao se comparar pela infecção por *L. braziliensis*. Estes resultados foram reforçados pelos maiores níveis intracitoplasmáticos de ROS e NO em neutrófilos, na presença de *L. braziliensis*, quando comparado à *L. amazonensis*. No intuito de se avaliar a possível participação dos receptores purinérgicos na resposta imune, foram utilizados quatro compostos: MRS 1754 (antagonista dos receptores A<sub>2B</sub>),  $\alpha\beta$ -metileno (bloqueador da atividade de CD73), suramina (antagonista dos receptores P2X e P2Y) e NECA (agonista dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>). Esta abordagem revelou que os neutrófilos estimulados com *L. amazonensis* na presença dos tratamentos MRS 1754 e NECA induzem aumento na síntese de NO, a suramina induz aumento da síntese de ROS e NO, enquanto o  $\alpha\beta$ -metileno reduz os níveis de ROS. Neutrófilos estimulados com *L. braziliensis* e tratados com MRS 1754 e suramina apresentaram aumento da síntese de ROS, o tratamento com NECA induziu aumento de NO, enquanto o tratamento com  $\alpha\beta$ -metileno reduziu os níveis de ROS. Após a realização deste estudo, ficou evidente que a *L. braziliensis* é capaz de induzir em neutrófilos um perfil mais pró-inflamatório, com a presença de altos níveis de ROS e NO, enquanto a *L.*

*amazonensis* apresenta maior atividade da enzima CD73, resultando em uma interação com neutrófilos mais favorável ao parasito.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*. *Leishmania braziliensis*. Neutrófilo. Receptores purinérgicos.

## ABSTRACT

The presence of ATP in the extracellular environment, may be interpreted as a "danger signal" by neutrophils, and their effects are dependent on factors such as the action of enzymes ectonucleosídeo 5'-triphosphate diphosphohydrolase - E-NTPDase (CD39) and 5' nucleotidase (CD73), in addition of ATP purinergic receptors. The present study evaluated the involvement of purinergic receptors in neutrophils immune response stimulated *in vitro*, with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania braziliensis*. Initial viability analysis of neutrophils infected with *L. amazonensis* or *L. braziliensis* showed that the percentage of viable cells was not changed. Higher percentage of *L. braziliensis* interaction with neutrophils was observed when compared to *L. amazonensis*. Although the analysis of the frequency of neutrophils expressing CD39 and CD73 was similar, regardless of the stimulus, only *L. amazonensis*- stimulated culture showed increased CD73 expression. Thus, there would be an increase in adenosine, which could contribute to a less pro-inflammatory microenvironment during infection by *L. amazonensis* in neutrophils, when comparing with infection *L. braziliensis*. These findings were reinforced by higher intracytoplasmic levels of ROS and NO in neutrophils in the presence of *L. braziliensis*, when compared to *L. amazonensis*. To evaluate the possible involvement of the purinergic receptors in the immune response, four compounds were used: MRS 1754 (antagonist of A<sub>2B</sub> receptor),  $\alpha\beta$ -methylene (CD73 blocking activity), suramin (antagonist of P2X and P2Y) and NECA (agonist of A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> receptors). This approach showed that neutrophils stimulated with *L. amazonensis* in the presence of MRS 1754 and NECA induce increased NO synthesis, suramin induces increased synthesis of ROS and NO, while the  $\alpha\beta$  methylene reduced levels of ROS. Neutrophils stimulated with *L. braziliensis* and treated with MRS 1754 and suramin exhibited increased ROS synthesis, treatment with NECA induced increase in NO production, while the  $\alpha\beta$ -methylene reduced ROS levels. After the realization of this study, it was evident that *L. braziliensis* is capable to induce neutrophil in a more pro-inflammatory profile, inducing high levels of ROS and NO, while the *L. amazonensis* showed higher CD73 enzyme activity, resulting in an interaction with neutrophils more favorable to the parasite.

Keywords: *Leishmania amazonensis*. *Leishmania braziliensis*. Neutrophil. Purinergic receptors.

## **LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Anticorpos utilizados para avaliação de marcadores de superfície ..... | 41 |
|--|----|

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Distribuição geográfica das principais espécies causadores da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.....   | 21 |
| Figura 2. Distribuição geográfica de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania braziliensis</i> na América do Sul e Central com seus respectivos vetores. ....   | 22 |
| Figura 3. Representação esquemática da membrana celular demonstrando o caminho percorrido pelo ATP até sua metabolização em adenosina, levando em consideração os pontos importantes para o presente trabalho .....  | 32 |
| Figura 4. Representação esquemática da membrana celular demonstrando os receptores purinérgicos, bem como as enzimas CD39 e CD73, destacando os locais específicos de ligação dos tratamentos utilizados para avaliar a relação dos mesmos à síntese de ROS e NO .....   | 39 |
| Figura 5. Marcação de zimosan A, <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. braziliensis</i> com AlexaFluor 647. A - Perfil de distribuição em gráfico de tamanho <i>versus</i> granulosidade para selecionar a população de zimosan.....  | 42 |
| Figura 6. Estratégia de análise referente ao perfil de interação de neutrófilos com <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A.. ....  | 47 |
| Figura 8. Avaliação do perfil de expressão de CD39 em neutrófilos de medula óssea.....   | 49 |
| Figura 9. Avaliação do perfil de expressão intracelular de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos de medula óssea.....   | 50 |
| Figura 10. Avaliação do perfil de expressão intracelular de óxido nítrico em neutrófilos de medula óssea.....  | 51 |
| Figura 11. Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (La), <i>L. braziliensis</i> (Lb) ou zimosan (Zy).....  | 53 |
| Figura 12. Interação entre neutrófilos e promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (La), <i>Leishmania braziliensis</i> (Lb) ou zimosan A (Zy), em diferentes tempos de cultivo (1h, 2h e 3h).....  | 55 |
| Figura 13. Expressão das ecto-nucleotidases CD39 e CD73 por neutrófilos, não estimulados (NE), ou na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (La), <i>L. braziliensis</i> (Lb) ou zimosan A (Zy).....   | 56 |
| Figura 14. Determinação da atividade das enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) (CD39) e 5' nucleotidase (CD73) na degradação do ATP, ADP e AMP por neutrófilos, não estimulados (NE), ou na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (La), <i>L. braziliensis</i> (Lb) ou zimosan A (Zy)..... | 57 |
| Figura 15. Produção de ROS por neutrófilos, não estimulados (NE), ou na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (La), <i>L. braziliensis</i> (Lb) ou zimosan A (Zy). ....   | 60 |

Figura 16. Produção de NO por neutrófilos, não estimulados (NE), ou na presença de promastigotas de *L. amazonensis* (La), *L. braziliensis* (Lb) ou zimosan A (Zy). .....63

Figura 17. Síntese dos resultados obtidos pela interação *in vitro* entre neutrófilos e *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. .....64

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                  |   |
|------------------|---|
| ADP              | <i>Adenosine Diphosphate</i>  |
| AF647            | <i>AlexaFluor 647</i>   |
| AG               | <i>Aminoguanidine</i>   |
| AMP              | <i>Adenosine Monophosphate</i>                                      |
| APC              | <i>Allophycocyanin</i>  |
| ATP              | <i>Adenosine Triphosphate</i>                                       |
| BSA              | <i>Bovine serum albumin</i>   |
| Ca <sup>2+</sup> | Íon de Cálcio   |
| cAMP             | <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>                               |
| carboxy-H2DCFDA  | <i>5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i> |
| CD               | <i>Cluster of Differentiation</i>                                   |
| CEUA             | Comissão de Ética no Uso de Animais                                 |
| CO <sub>2</sub>  | Dióxido de Carbono  |
| CTCM             | <i>Complete Tissue Culture Medium</i>                               |
| DAF-2            | <i>4,5-Diaminofluorescein</i>                                       |
| DAF-2DA          | <i>4,5-Diaminofluorescein diacetate</i>                             |
| DAF-2T           | <i>Triazolofluorescein</i>  |
| DMSO             | <i>Dimethyl Sulfoxide</i>   |
| DNA              | <i>Deoxyribonucleic acid</i>  |
| DPI              | <i>Diphenyleneiodonium chloride</i>                                 |
| EDTA             | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>                             |
| ERK              | <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>                       |
| IGF              | <i>Insulin-like growth factor</i>                                   |
| FITC             | <i>Fluorescein isothiocyanate</i>                                   |
| FSC              | <i>Forward-scattered light</i>                                      |
| GM-CSF           | <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>             |
| HCl              | Ácido Clorídrico  |
| HEPES            | <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>           |
| IDRM             | Intradermorreação de Montenegro                                     |
| IL               | <i>Interleukin</i>  |
| IMF              | Intencidade Média de Fluorescência                                  |
| iNOS             | <i>Inducible nitric oxide synthase</i>                              |
| InsP3            | <i>Inositol trisphosphate receptor</i>                              |
| JNK              | <i>c-Jun N-terminal kinases</i>                                     |
| K <sup>+</sup>   | Íon de Potássio   |
| La               | <i>Leishmania amazonensis</i>                                       |
| Lb               | <i>Leishmania braziliensis</i>                                      |
| LC               | Leishmaniose Cutânea  |
| LCL              | Leishmaniose Cutânea Localizada                                     |
| LM               | Leishmaniose Mucosa   |
| LPG              | Lipofosfoglicano glicoconjugado                                     |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| LPS                             | Lipopolissacarídeo   |
| LT                              | Leishmaniose Tegumentar  |
| LV                              | Leishmaniose Visceral  |
| MCP-3                           | <i>Monocyte-specific chemokine 3</i>   |
| Mg <sup>2+</sup>                | Íon de Magnésio  |
| MgCl <sub>2</sub>               | Cloreto de magnésio  |
| MIP                             | <i>Macrophage inflammatory protein</i>   |
| MPO                             | <i>Myeloperoxidase</i>   |
| MRS 1754                        | <i>8-[4-[(4-Cyanophenyl)carbamoylmethyl]oxy]phenyl]-1,3-di(n-propyl)xanthine hydrate</i> |
| MS                              | Ministério da Saúde  |
| Na <sup>+</sup>                 | Íon de Sódio   |
| Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | Fosfato de Sódio   |
| NaCl                            | Cloreto de Sódio   |
| NADPH                           | <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>                               |
| NE                              | Não Estimulada   |
| NECA                            | <i>5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosine</i>  |
| NET                             | <i>Neutrophil Extracellular Trap</i>   |
| NF-κB                           | <i>Nuclear factor kappa B</i>  |
| NH <sub>4</sub> Cl              | Cloreto de Amônio  |
| NK                              | <i>Natural Killer</i>  |
| NO                              | <i>Nitric Oxide</i>  |
| NT                              | Não Tratado  |
| P1                              | Receptor purinérgico (do tipo P1) para adenosina   |
| P2                              | Receptor purinérgico (do tipo P2) para ATP, ADP e UTP                                    |
| PAMP                            | <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>   |
| PBS                             | <i>Phosphate buffered saline</i>   |
| PBS-W                           | <i>Phosphate buffered saline - Wash</i>  |
| PE                              | <i>Phycoerythrin</i>   |
| PDGF                            | <i>Platelet-derived growth factor</i>  |
| Pi                              | <i>Inorganic phosphate</i>   |
| PI3K                            | <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>   |
| PKA                             | <i>Protein kinase A</i>  |
| PRR                             | <i>Pattern recognition receptor</i>  |
| RNS                             | <i>Reactive Nitrogen Species</i>   |
| ROS                             | <i>Reactive Oxygen Species</i>   |
| SFB                             | Soro fetal bovino  |
| SSC                             | <i>Side-scattered light</i>  |
| TGF                             | <i>Tumor Groeth Factor</i>   |
| TNF                             | <i>Tumor Necrosis Factor</i>   |
| UTP                             | <i>Uracil Triphosphate</i>   |
| Zn <sup>2+</sup>                | Íon de Zinco   |
| Zy                              | Zimosan A  |
| αβ-metileno                     | <i>Adenosine 5'-(α,β-methylene)diphosphate</i>   |



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1- INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>18</b> |
| 1.1 - Aspectos gerais das Leishmanioses .....  | 18        |
| 1.2 - Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar: formas clínicas, epidemiologia e ciclo biológico.....  | 19        |
| 1.3 - Aspectos gerais da resposta imune na infecção por <i>Leishmania</i> .....  | 23        |
| 1.4 Participação dos neutrófilos na resposta imune anti- <i>Leishmania</i> .....   | 26        |
| 1.5 Participação do ATP, adenosina e seus receptores na resposta imune...29  |           |
| <b>2 – JUSTIFICATIVA.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>3 – OBJETIVO.....</b>   | <b>34</b> |
| 3.1 – Objetivo Geral.....  | 34        |
| 3.2 – Objetivos Específicos .....  | 34        |
| <b>4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>35</b> |
| 4.1 - Animais.....   | 35        |
| 4.2 - Obtenção e purificação de neutrófilos da medula óssea de camundongos C57BL/6.....  | 35        |
| 4.3 – Cultura de Parasitos .....   | 37        |
| 4.4 - Preparação do estímulo inespecífico zimosan.....   | 37        |
| 4.5 – Cultivo de neutrófilos na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. braziliensis</i> ou zimosan A.....   | 38        |
| 4.6 - Avaliação da viabilidade de neutrófilos estimulados <i>in vitro</i> com promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A .....  | 40        |
| 4.7 - Avaliação da interação entre neutrófilos e promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A.....  | 40        |
| 4.8 - Avaliação da expressão das ecto-nucleotidases CD39 e CD73 por neutrófilos cultivados <i>in vitro</i> com promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A .....   | 43        |
| 4.9 - Determinação da atividade enzimática da ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) e 5' nucleotidase de neutrófilos cultivados <i>in vitro</i> com promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A ..... | 43        |
| 4.10 - Avaliação da expressão de espécies reativas do oxigênio por neutrófilos cultivados <i>in vitro</i> com promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A .....  | 44        |
| 4.11 - Detecção da produção de óxido nítrico por neutrófilos estimulados com promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A .....   | 45        |
| 4.12 – Estratégias de Análise.....   | 46        |
| 4.12.1 - Análise da interação de neutrófilos em cultivo com promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A.....   | 46        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.12.2 - Análise da expressão das enzimas CD39 e CD73 por neutrófilos em cultivo com promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A.....  | 47        |
| 4.12.3 - Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos em cultivo com promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> ou <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A.....  | 49        |
| 4.12.4 - Análise da síntese de óxido nítrico por neutrófilos em cultivo com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. braziliensis</i> ou zimosan A.....   | 50        |
| 4.13 - Análise estatística dos dados .....   | 51        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>  | <b>52</b> |
| 5.1 - Avaliação da viabilidade de neutrófilos na presença de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A.....   | 52        |
| 5.2 - Avaliação da interação entre neutrófilos na presença de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A.....  | 54        |
| 5.3 - Avaliação da expressão das ecto-nucleotidases (CD39 e CD73) em neutrófilos na presença de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>Leishmania braziliensis</i> ou zimosan A.....  | 55        |
| 5.4 - Avaliação da atividade das enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) (CD39); e 5' nucleotidase (CD73) de neutrófilos na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> ou zimosan A..... | 57        |
| 5.5 - Avaliação dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em neutrófilos na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> ou zimosan A.....  | 58        |
| 5.6 - Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico (NO) em neutrófilos na presença de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> ou zimosan A.....   | 61        |
| <b>6 – DISCUSSÃO.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>7 – CONCLUSÃO.....</b>  | <b>73</b> |
| <b>8 – REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>74</b> |
| <b>9 – ANEXOS.....</b>   | <b>89</b> |

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1 - Aspectos gerais das Leishmanioses

As leishmanioses estão entre as dez endemias mundiais de prioridade absoluta da Organização Mundial da Saúde (OMS) devido ao caráter endêmico em 98 países de diversas regiões do mundo, concentradas em áreas tropicais e subtropicais da América, África, Ásia e Europa (David & Craft, 2009; Ameen, 2010; WHO, 2014). O número de pessoas infectadas está estimado em aproximadamente 12 milhões, além disso, cerca de 367 milhões se encontram em risco de adquirir a doença (WHO, 2014).

As leishmanioses referem-se a um espectro de doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Os parasitos são transmitidos pela picada de insetos fêmea pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, e gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. O gênero *Leishmania* compreende parasitos intracelulares obrigatórios que se reproduzem por divisão binária, dentro de células fagocíticas mononucleares de mamíferos suscetíveis (Laison *et al.*, 1987). A diversidade de espécies de *Leishmania*, associada à capacidade da resposta imune de cada indivíduo à infecção, está relacionada com a manifestação de várias formas clínicas das leishmanioses. Em função do caráter espectral das manifestações clínicas, diferentes classificações para a doença já foram propostas (Pearson & Sousa 1996, Grevelink & Lerner 1996). Entretanto a WHO (2014) divide e caracteriza as leishmanioses em dois grupos: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). Assim como outras doenças parasitárias endêmicas, as leishmanioses têm sido relacionadas a áreas de pobreza e escassos recursos humanos e econômicos para seu controle e profilaxia (MS, 2007). Os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) são as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses (MS, 2007). Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido. Acredita-se que interferem no metabolismo bioenergético das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos, reduzindo a produção de ATP e GTP (Berman, 1988; MS, 2007). No Brasil o medicamento de escolha para o tratamento das leishmanioses é o Glucantime®, que na forma cutânea, tem eficácia variável dependendo da região estudada e do esquema de tratamento empregado (MS, 2007).

Destaca-se que a cura das leishmanioses é apenas clínica, uma vez que os parasitos permanecem, em baixa concentração, no corpo do indivíduo por toda a vida (MS, 2007).

## **1.2 - Aspectos gerais da Leishmaniose Tegumentar: formas clínicas, epidemiologia e ciclo biológico**

Considerando as particularidades relacionadas a resposta do hospedeiro da infecção por *Leishmania*, da localização das lesões bem como da evolução clínica, Awasthi *et al.* (2004) propuseram uma classificação clínica para a LT. Sendo assim, a LT foi subdividida em quatro formas clínicas: (1) leishmaniose cutânea, causada principalmente por *L. braziliensis* e *L. guyanensis* no Novo Mundo, e *L. tropica*, *L. major* (forma zoonótica) e *Leishmania aethiopica* no Velho Mundo, e caracterizada por úlcera no local do repasto sanguíneo e, na maioria dos casos, com resolução espontânea; (2) leishmaniose cutânea disseminada, causada principalmente por *L. braziliensis*, e caracterizada por várias lesões não contíguas formadas pela disseminação do parasito por vias hematogênica ou linfática; (3) leishmaniose mucocutânea, causada normalmente por *L. braziliensis*, e caracterizada por resposta imune exacerbada e ineficaz, com acometimento das mucosas, principalmente da região nasofaringe, onde são encontradas lesões destrutivas que podem levar a desfiguração; e (4) leishmaniose difusa, forma clínica rara, porém grave, associada à lesão difusa não ulcerada, rica em parasito, e também a um processo anérgico, onde a resposta de linfócitos T é ausente ou muito prejudicada, tendo como principal agente etiológico *L. amazonensis* e *Leishmania pifanoi* (Herwaldt 1992; McMahon-Pratt & Alexander, 2004; González *et al.*, 2009).

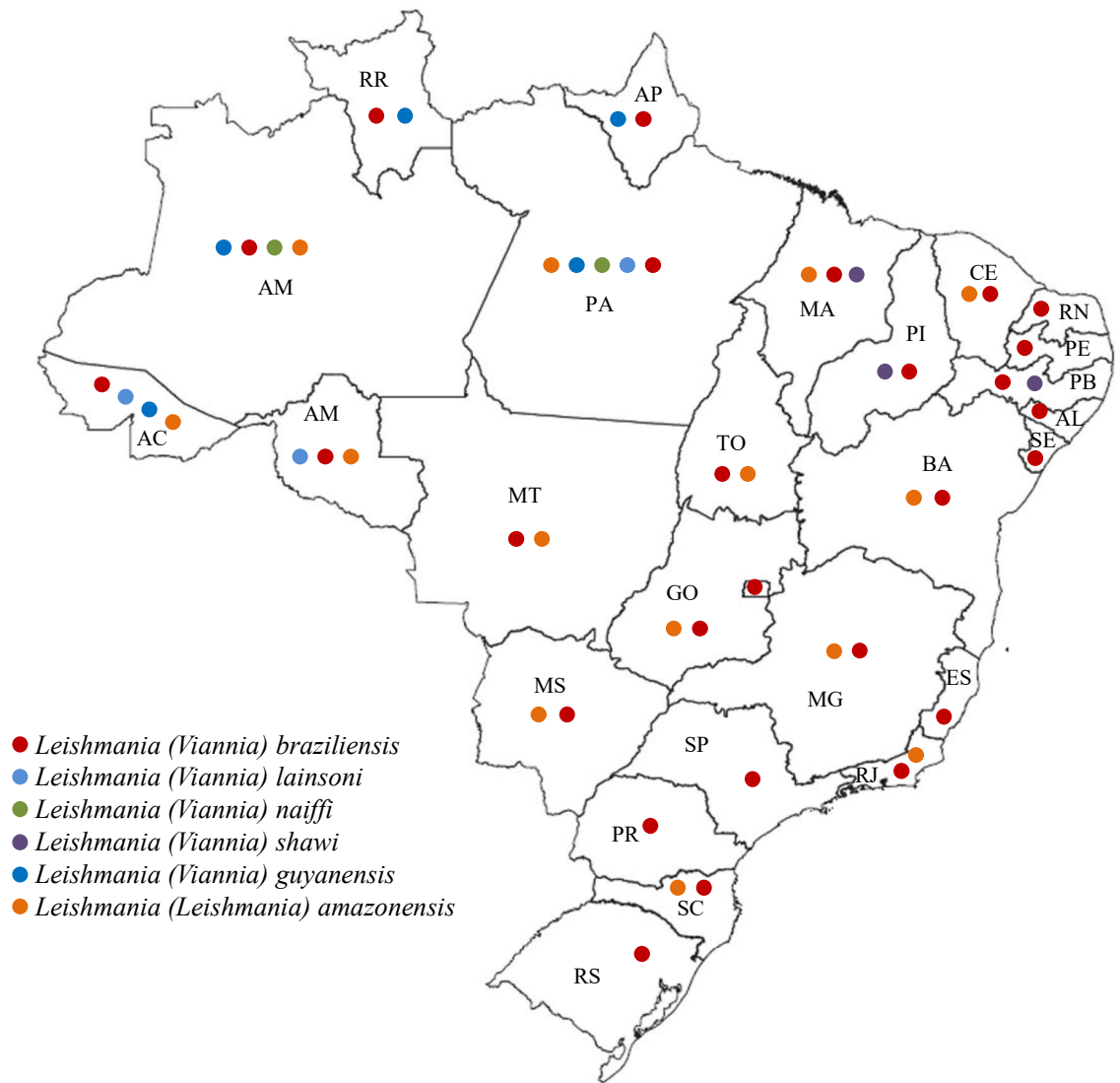
Segundo a OMS, a incidência anual estimada para LT é de 700.000 a 1,2 milhões de casos (WHO, 2014). No Brasil, verificou-se no período de 1985 a 2012, uma média anual de 25.426 casos autóctones de LT, sendo 9.141 no ano 2012 (MS, 2014). No estado de Minas Gerais, desde a década de 1950, época em que a doença foi descrita, os surtos registrados de LT tem sido relacionados, quase exclusivamente, às atividades de desmatamento (Gontijo *et al.*, 2002). Entretanto, a partir da década de 1990, a epidemiologia da doença tem sofrido alterações, sendo descritos casos em áreas periurbanas de cidades de médio e grande porte (Passos *et al.*, 1993; Kawa *et al.*, 2010; Shimabukuro *et al.*, 2010; Bacha *et al.*, 2011; Quaresma, 2014), além das áreas de colonização antiga. Minas Gerais apresenta atualmente um dos maiores números de casos de LT dentre os estados brasileiros, onde foram notificados

nos anos de 2008 a 2012 – 1.160, 1.047, 1.926, 1.746, 1.041 casos da doença, respectivamente (SES-MG, 2013).

A LC é amplamente distribuída, e cerca de um terço dos casos ocorrem em cada uma das três regiões epidemiológicas: nas Américas, bacia do Mediterrâneo e Ásia Ocidental do Oriente Médio à Ásia Central. Os dez países com o maior número de casos confirmados são o Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, e, juntos, representam de 70 a 75% da incidência de LC em todo o mundo (WHO, 2014).

A LC pode ser causada por qualquer espécie de *Leishmania*, e seu período de incubação varia de 15 dias a 8 semanas. Inicialmente, forma-se um nódulo cutâneo único ou múltiplo no local da inoculação, que evolui para a úlcera, geralmente pouco dolorosa. O tamanho da lesão também é variável, podendo alcançar apenas alguns milímetros ou até mesmo mais de 10 centímetros. Além das lesões cutâneas clássicas podem ocorrer casos assintomáticos que são confirmados durante inquéritos epidemiológicos com indivíduos que possuem intradermoreação de Montenegro (IDRM) positiva, mas que não apresentam cicatrizes nem história de lesões. Existem ainda, relatos de formas subclínicas que evoluem para cura espontânea dentro de 6 a 15 meses, aproximadamente (David & Craft, 2009).

No Brasil, foram identificadas sete espécies de *Leishmania* amplamente distribuídas como agentes etiológicos da LC: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (Grimaldi *et al.*, 1989; Silveira *et al.*, 2002). A espécie *L. braziliensis* é a mais prevalente na região nordeste do Brasil e amplamente distribuída pelo território nacional, e principal causadora das formas cutânea, mucosa e disseminada, enquanto a *L. amazonensis* causa principalmente, a forma cutânea, e em alguns casos a difusa, e também é amplamente distribuída pelo Brasil (Carvalho *et al.* 2005, De Oliveira & Barral-Netto, 2005). A Figura 1 representa a distribuição das principais espécies causadoras da LT no Brasil (MS, 2007). A Figura 2 está representado a distribuição das espécies *L. amazonensis* e *L. brasiliensis*, bem como seus respectivos vetores, na América do Sul e Central (Sharma & Singh, 2008).



**Figura 1. Distribuição geográfica das principais espécies causadores da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil (MS, 2007).**



**Figura 2.** Distribuição geográfica de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* na América do Sul e Central com seus respectivos vetores (Sharma & Singh, 2008).

Com relação aos aspectos biológicos, *Leishmania* spp. é um parasito digenético (heteroxeno), que circula entre os hospedeiros vertebrados e seus vetores, sob as formas amastigotas (ovais e sem flagelo aparente) dentro das células do sistema mononuclear fagocitário dos mamíferos, e sob duas formas flageladas no tubo digestivo dos flebotomíneos (promastigotas procíclicas e metacíclicas) (Bastien *et al.*, 1992; Pinto-da-Silva *et al.*, 2002). A forma infectante de *L. braziliensis*, assim como nas outras espécies de *Leishmania*, é a promastigota metacíclica, transmitida ao hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo do inseto vetor (Sack, 1989; Muskus & Marín Villa, 2002). Desta forma, quando o flebótomo ingere o sangue com as amastigotas que alcançam o intestino médio do vetor, apresentam um primeiro ciclo replicativo, e se transformam em formas promastigotas procíclicas flageladas. Além disso, através de processos sucessivos de divisão binária, se multiplicam ainda no sangue ingerido, que é envolto por uma membrana peritrófica, secretada pelas células do trato digestório do inseto (Sack, 1989; Muskus & Marín Villa, 2002). Durante o processo de digestão do sangue, algumas formas promastigotas podem atravessar a membrana peritrófica, favorecendo a colonização do parasito na região do piloro e ílio. Neste locais, permanecem aderidos pelo flagelo ao epitélio intestinal, por meio de hemidesmossomos, com o auxílio do

lipofosfoglicano (LPG) . Nesta fase, os parasitos sofrem sucessivas divisões celulares até atingir a fase metacíclica (término do ciclo replicativo), quando ocorrem mudanças estruturais nas moléculas de LPG ancoradas na membrana extracelular do parasito. Posteriormente, mudam o tamanho ou adicionam ramificações ao LPG, diminuindo a sua afinidade pelo intestino do vetor e, dessa forma, deixam o intestino e migram em direção à probóscida do inseto, onde permanecem até o próximo repasto sanguíneo (Sack, 1989; Muskus & Marín Villa, 2002). A partir da deposição das formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado (homem - hospedeiro acidental), inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro, que é crucial no estabelecimento e controle da infecção (MS, 2006).

### **1.3 - Aspectos gerais da resposta imune na infecção por *Leishmania***

Como descrito por Awasthi *et al.* (2004), o curso das infecções causadas por *Leishmania* são tão dependentes da espécie envolvida, bem como dos aspectos imunológicos do hospedeiro, fator esse, que, torna as leishmanioses um interessante modelo para demonstrar a íntima e complexa relação parasito-hospedeiro. Estudos que visaram avaliar esses fatores, resultantes em resistência ou susceptibilidade à *Leishmania*, em sua maioria utilizaram *L. major* em camundongos geneticamente resistentes (CH3, C57BL/6 ou CBA) ou susceptíveis (BALB/c) (Kopf *et al.*, 1996; Menon e Bretscher, 1998; Anderson *et al.*, 2005; Okwor *et al.*, 2014), bem como a espécie *L. amazonensis* (Afonso & Scott, 1993, Soong *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002). A utilização de diferentes modelos experimentais possibilita mimetizar vários aspectos da infecção humana, de modo que permitiria elucidar detalhes da resposta imune do hospedeiro durante o curso da infecção (Chorilli *et al.*, 2007).

Atualmente, sabe-se que a caracterização de um perfil de susceptibilidade ou resistência à infecção por *Leishmania*, tem como base as informações obtidas nos trabalhos que utilizaram modelo murino infectado por *L. major* ou *L. amazonensis* (Afonso & Scott, 1993, Soong *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002). Esses trabalhos iniciais descreveram que ao se utilizar o mesmo hospedeiro e diferentes cepas ou espécies dos parasitos, muito embora a resposta protetora fosse sempre dependente da produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), a susceptibilidade à infecção nem sempre dependia da produção da interleucina (IL)-4. Follador *et al.* (2002) avaliaram a resposta imune celular associada com resistência natural à leishmaniose em indivíduos assintomáticos, que apresentavam



intradermorreação de Montenegro (IDRM) positiva, mas sem história prévia da doença e sem lesão aparente e observaram que pacientes considerados resistentes apresentavam níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  mais baixos e níveis de IL-5 mais elevados no sobrenadante de cultura de linfócitos, quando comparados à pacientes com lesão ativa. Os autores sugerem que este perfil misto de citocinas poderia modular a resposta imunológica, diminuindo a reação inflamatória e consequentemente o surgimento da lesão. Posteriormente, Baratta-Masini *et al.*, (2007) demonstraram que indivíduos considerados resistentes apresentavam um perfil de citocinas do tipo 0 (IL-4, IL-5, IL-13 e IFN- $\gamma$ ), com níveis de produção basal. Contudo, estes indivíduos também apresentavam em análises de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Leishmania* menor frequência de células T IL-4<sup>+</sup>, elevada razão entre células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>/IL10<sup>+</sup> e altos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato, sugerindo que a maior proporção de citocinas do tipo 1 em relação às do tipo 2 contribui para prevenir o crescimento dos parasitos e o desenvolvimento de lesões. Freitas-Teixeira *et al.* (2012) mostraram em indivíduos MT<sup>+</sup> (positivos para IDRM) maior capacidade leishmanicida *in vitro*, evidenciada pelo aumento de neutrófilos HLA-DR<sup>+</sup>, monócitos CD23<sup>+</sup> e maior razão linfócitos T CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>.

Estudos em modelo murino demonstram que a resistência ou susceptibilidade a infecção por *Leishmania* é dependente do tipo de linhagem de camundongo (relacionado ao *background* genético do hospedeiro), bem como de aspectos relacionados ao parasito (espécie e cepa). Neste sentido, De Oliveira *et al.* (2004) observaram que BALB/c infectados com duas cepas de *L. braziliensis* (H3227 e BA788) são capazes de responder de formas distintas. Neste estudo foi demonstrado que a linhagem de camundongo H3227 induziu uma resposta imune do Tipo 1, enquanto a linhagem BA788 permitiu o estabelecimento de uma resposta do Tipo 2. Além dessas questões imunológicas, Silva-Junior *et al.* (2014) demonstraram que aspectos relacionados ao parasito são determinantes para o estabelecimento da infecção. Assim, estes autores demonstraram que a infecção em macrófagos humanos é maior para as cepas de *L. amazonensis* (PH8 e MAB6) em relação as de *L. braziliensis* (M2903, IMG3 e PPS6m). De forma interessante, alterações podem ser observadas em diferentes cepas da mesma espécie, sendo descrito maior infecção para a cepa MAB6 em relação a cepa PH8 (Silva-Junior *et al.*, 2014).

Kobayashi & DeLeo (2009) e Charmoy *et al.* (2010) observaram que os eventos iniciais da infecção por *Leishmania* (primeiras horas até 3 dias) são de extrema importância no desenvolvimento de uma resposta imune protetora ou favorável à infecção. Nesse sentido,

o estudo das células da imunidade inata como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas são de grande relevância para o entendimento da formação do ambiente inflamatório, bem como, para o recrutamento de células da resposta imune adaptativa que direcionam efetivamente o curso da infecção. Os macrófagos são considerados as principais células da imunidade inata, com um papel intrigante na leishmaniose, pois servem ao mesmo tempo como células hospedeiras para os parasitos, permitindo a sobrevivência e multiplicação de amastigotas de *Leishmania*, e como células reguladoras da resposta imune, equipadas para destruírem esses parasitos. Outros tipos celulares, como os neutrófilos e células dendríticas, também são infectadas e desempenham papel importante na infecção (Awasthi *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2008; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012).

Diferentes trabalhos mostraram que neutrófilos podem prejudicar a eliminação do parasito, uma vez que, macrófagos não ativam os mecanismos leishmanicidas após a fagocitose de neutrófilos infectados e apoptóticos, favorecendo assim a sobrevivência do parasito no hospedeiro (Laskay *et al.*, 2003; Afonso *et al.*, 2008; John & Hunter, 2008; Peters *et al.*, 2008; Novais *et al.*, 2009).

Apesar da maioria dos microorganismos fagocitados serem mortos facilmente dentro dos neutrófilos, vários patógenos intracelulares obrigatórios ou facultativos sobrevivem neste ambiente hostil. O processo de retardo da apoptose dos neutrófilos é geralmente um mecanismo de escape dos patógenos residentes nestas células. No entanto, depois de 2-4 dias os neutrófilos entram em apoptose e são fagocitados pelos macrófagos. Pelo fato dos microorganismos entrarem nos macrófagos via fagocitose de neutrófilos apoptóticos, estes podem sobreviver e multiplicar nos macrófagos e, dessa forma, neutrófilos apoptóticos podem servir como “cavalo de tróia” para determinados patógenos (Laskay *et al.*, 2008; John & Hunter, 2008; Peters *et al.*, 2008). Ribeiro-Gomes *et al.* (2004) mostraram que a interação, *in vitro*, entre macrófagos infectados e neutrófilos apoptóticos alteram o perfil da infecção por *L. major*, uma vez que ocorreu aumento da carga parasitária em animais BALB/c. Entretanto, em animais C57BL/6 foi observado aumento na produção de Fator de Necrose Tumoral-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e morte do parasito. Além disso, neste estudo ficou documentado que a depleção de neutrófilos, *in vivo*, causa aumento da carga parasitária em camundongos C57BL/6. De forma intrigante, outro estudo de Ribeiro-Gomes *et al.* (2012) mostrou que células dendríticas reduzem a expressão de marcadores de ativação e capacidade de apresentação do antígeno após a fagocitose de neutrófilos apoptótico infectados por *L. major*. Diferentes estudos, *in vitro* e *in vivo*, têm buscado compreender o papel de neutrófilos na infecção por *Leishmania*

(Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Aga *et al.*, 2002; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004, 2007; Peters *et al.*, 2008, Peters & Sacks, 2009; Charmoy *et al.*, 2010; Filardy *et al.*, 2010), entretanto, devido a grande diversidade de espécies de hospedeiro (humano, cão, camundongos de diferentes linhagens), ou pelo tecido (sangue, peritônio, pele, medula óssea) ou tempo de recrutamento (horas, dias, semanas) o impacto da resposta de neutrófilos em promover resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* permanece em debate.

#### **1.4 Participação dos neutrófilos na resposta imune anti-*Leishmania***

Tendo em vista a importância das células da resposta imune inata perante as diferentes infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, vários autores demonstraram que a participação dos neutrófilos é crucial. Os neutrófilos são descritos como células efectoras de curta duração, constituintes do sistema imune inato e do sistema fagocítico (Ley *et al.*, 2007, Phillipson *et al.*, 2011) sendo recrutados com poucas horas de infecção, diminuindo sua migração após três dias de infecção (Charmoy *et al.*, 2010). Apesar de possuírem vida curta, entrando em apoptose 3-4 após fagocitose do patógeno, a apoptose poderia ser retardada dependendo do patógeno envolvido. Como observado por Zhong *et al.* (2006) Massari & Wetzler (2000) em que foi observado que *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria meningitidis*, respectivamente, impedem a liberação do citocromo pelas mitocôndrias, retardando o a apoptose da célula infectada. São as primeiras células a serem recrutadas para o sítio de inflamação e possuem uma ampla variedade de mecanismos pelos quais eliminam o patógeno. Primeiramente, após a fagocitose, os neutrófilos são capazes de eliminar o patógeno, que se encontra envolto pelo fagolisossomo, através da síntese de Espécies Reativa de Oxigênio (ROS) e Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS), com destaque para o Óxido Nítrico (NO). Ambos possuem atividade microbicida, interagindo com a membrana fosfolipídica dos parasitos, rompendo-as (Nathan & Shiloh, 2000; Awasthi *et al.*, 2004). Porém, a produção, de ROS e NO, em elevados níveis pode causar danos em macromoléculas como lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, podendo afetar também, a função celular, causando danos teciduais (Vouldoukis, 1995). Deane (1938) demonstrou, em esfregaço de medula óssea de pacientes infectados, que neutrófilos são capazes de fagocitar amastigotas de *L. donovani*. De maneira interessante, diferentes estudos usando parasitos marcados com fluorocromo mostraram que a célula predominantemente infectada após poucas horas de infecção por *L. major* ou *L. donovani*, na derme da orelha de camundongos (C57BL/6 e BALB/c) foram os

neutrófilos (Peters *et al.*, 2008; Thalhafer *et al.*, 2011; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012). Dessa forma, já foi demonstrado que a capacidade fagocítica está diretamente relacionada à produção de metabólitos da explosão respiratória, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) que são importantes mediadores leishmanicidas (Horta *et al.*, 2012; Charmoy *et al.*, 2007). Nathan & Shiloh (2000) mostraram que neutrófilos e macrófagos podem produzir NO em resposta ao IFN- $\gamma$ , juntamente com o segundo sinal gerado pelos receptores de reconhecimento de patógenos ou com TNF- $\alpha$ . Além disso, Charmoy *et al.* (2007) mostraram que a produção de NO por neutrófilos de camundongos (C57BL/6) infectados por *L. major* estava relacionado ao perfil de proteção à infecção. Diferentes estudos, *in vitro*, mostraram que neutrófilos humanos infectados com diferentes formas de *L. donovani* induziram a morte do parasito através dos metabólitos do oxigênio gerados pela explosão respiratória, após processo de fagocitose (Chang, 1981; Pearson & Steigbigel, 1981). Neste sentido, diferentes estudos com *Leishmania* sp. mostraram que neutrófilos humanos e murinos induziram a morte do parasito através da produção de NO (Nussler & Billiar, 1993; Fonseca *et al.*, 2003) e ROS (Segal, 2005; Falcão *et al.*, 2015). Por outro lado, Carlsen *et al.* (2013), demonstraram que *L. amazonensis* é capaz de ativar os neutrófilos que eliminam formas promastigotas, mas é incapaz de eliminar as formas amastigotas desse parasito, sugerindo a importância desta população celular nos eventos iniciais da infecção por *L. amazonensis*.

Outra característica marcante dos neutrófilos é a presença de grânulos, formados durante sua maturação e que possuem diferentes proteínas pró-inflamatórias, como mieloperoxidase (MPO), lactoferrina, gelatinase, catepsina, lisozima e defensinas. Esses grânulos podem ser desgranulados nos fagolisossomos ou no meio extracelular, agindo tanto em patógenos intracelulares quanto extracelulares (Borregaard & Cowland, 1997; Faurschou & Borregaard, 2003; Hager *et al.*, 2010). Além disso, já foi demonstrado que neutrófilos ativados são capazes de eliminar patógenos extracelulares pela liberação de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NET), que são constituídas parcialmente por DNA com histonas, além de proteínas (como lactoferrina, catepsina, MPO e elastase) impedindo que o parasito se espalhe pelo organismo. Além de facilitar a fagocitose, alguns autores sugerem que as NETs causam morte direta do parasito (Brinkmann *et al.*, 2004; Papayannopoulos & Zychlinsky, 2009; Phillipson *et al.*, 2011). Após liberação dos grânulos, os neutrófilos iniciam um segundo *burst* transcricional, resultando na produção de várias citocinas (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-8 e IL-10 e IL-12) e quimiocinas (CCL3, CCL5, CCL7, CXCL2 e CXCL3) (Borregaard *et al.*, 2007).

A inflamação é um mecanismo complexo de defesa caracterizado pela migração e ativação de leucócitos para o tecido no qual o agente infeccioso está presente. A migração de neutrófilos para o local é um bom marcador da inflamação aguda (Ryan & Majno, 1977). Alguns trabalhos abordam os mecanismos envolvidos no processo de migração dos neutrófilos para o local ao qual são necessários, sendo de conhecimento que a migração dessas células é relacionada à cinética de expressão de moléculas de adesão endotelial. Neutrófilos expressam grande variedade de integrinas e selectinas em sua superfície, das quais cabe destacar o papel das integrinas CD11b e CD49d da subfamília  $\beta$  que apresentam papel importante na adesão ao endotélio na migração para o sítio inflamatório (Coxon *et al.*, 1996), bem como, na infecção por *L. major*, como mostrado em diferentes trabalhos (Rosenthal *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 2004; Charmoy *et al.*, 2007). A selectina CD62L é expressa em leucócitos, sendo a principal molécula de adesão em neutrófilos, de modo que é comumente utilizada como marcador de ativação, uma vez que neutrófilos ativados deixam de expressar essa molécula (Smalley & Ley, 2005; Mastej & Adamiec, 2008).

A resposta inicial do hospedeiro ao patógeno é rapidamente gerada pela resposta imune inata que pode levar à eliminação do microorganismo. Essa resposta depende de um sofisticado arranjo de receptores de reconhecimento de padrão (PRR) que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), como lipoproteínas, lipopeptídeos, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, dentre outros (Meneghin & Hogaboam, 2007). A expressão destes PPRs ocorre em células do sistema imune como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), além de fibroblastos, células epiteliais e adipócitos (Takeda & Akira, 2004).

Devido a capacidade altamente inflamatória dos neutrófilos, que eventualmente podem induzir lesão tecidual, diferentes mecanismos auxiliam na regulação da atividade destas células. Um desses mecanismos, a formação de lipoxina a partir do ácido araquidônico, reduz o recrutamento de novos neutrófilos para o local de inflamação (Levy *et al.*, 2001). A atividade dessas células também é controlada pelos macrófagos, que ao fagocitarem neutrófilos apoptóticos, aumentam a síntese TGF- $\beta$  e reduzem a de TNF- $\alpha$  e MIP<sub>2</sub> (Huynh *et al.*, 2002). Em adição a esses mecanismos, a ação da adenosina é um importante modulador da atividade dos neutrófilos, uma vez que seus efeitos é dose dependente (Linden, 2001).

## 1.5 Participação do ATP, adenosina e seus receptores na resposta imune

O ATP (adenosina 5'-trifosfato) é uma molécula amplamente estudada, e descrita como fonte de energia química para a maioria das atividades celulares, ou atuando como substrato na transdução de uma via de sinalização. Apesar do vasto conhecimento adquirido sobre suas funções, pouco se sabe sobre sua participação como molécula de sinalização no espaço extracelular. A presença do ATP nesses espaços pode ocorrer pela sua liberação por células intactas (Burnstock *et al.*, 2010), células necróticas ou apoptóticas, e caso presente no espaço extracelular, é considerado como um “sinal de perigo” (Elliott *et al.*, 2009). Uma vez liberado, o ATP pode desencadear uma resposta inflamatória, caracterizada pela secreção de diferentes citocinas, tais como IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , além de induzir migração de monócitos (Bours *et al.*, 2006; Elliott *et al.*, 2009). Durante o processo inflamatório, há um acúmulo local de neutrófilos e um eventual dano tecidual, como consequência, uma concentração significativa de ATP pode ser observada no ambiente extracelular desses tecidos (Linden, 2001).

Os efeitos decorrentes da liberação do ATP são dependentes da dose, do tempo de exposição, tipo de célula envolvida e ação das ectonucleosídeo trifosfato defosforilase 1 (CD39) e ecto-5'-nucleotidase (CD73), que agem sobre o ATP e seus metabólitos. O CD39, expresso por grande parte dos leucócitos, converte o ATP em AMP, gerando o intermediário ADP, e requer  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  como cofatores. Na sequência da metabolização do ATP e seus metabólitos, a enzima CD73 é a responsável pela desfosforilação do AMP em adenosina, e possui o  $\text{Zn}^{2+}$  como cofator (Marcus *et al.*, 2003). Tendo em vista a participação no meio extracelular do ATP e seus metabólitos, 19 receptores aos quais essas moléculas se ligam foram descritos nos últimos anos (Burnstock *et al.*, 2012). Os receptores purinérgicos, assim chamados, são divididos em dois grupos, receptores P1, que são seletivos para adenosina, e os receptores P2 que são seletivos para ATP, ADP e UTP (Burnstock *et al.*, 2012).

Os receptores P1 são divididos em quatro subtipos,  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ , e são associados a uma proteína G. A atividade desses receptores se dá principalmente pela ativação ou inibição da adenilato ciclase, o que ocasiona em aumento ou redução na concentração de cAMP. Nos estudos de van Calcar *et al.* (1979) e Bruns *et al.* (1986) foi constatado que os receptores  $A_1$  e  $A_3$  são responsáveis por reduzir a concentração de cAMP, e os  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  pelo seu aumento, além de ser constatado que receptores  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  possuem menor afinidade pela adenosina, em relação aos  $A_1$  e  $A_3$  (Abbracchio & Ceruti, 2007). Essa diferença de afinidade

pela adenosina torna o seu efeito dose dependente, sendo a afinidade dos receptores  $A_1$  e  $A_3$  maior que a dos receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ , uma menor concentração extracelular de adenosina é necessário para ativá-los, logo para a ativação dos receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  é necessário maiores concentrações (Marcus *et al.*, 2003). O cAMP, que é um segundo mensageiro, interage com diferentes moléculas efetoras, como proteína cinase A (PKA), proteína de troca diretamente ativada por cAMP (Epac) e a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (especialmente para o receptor  $A_{2B}$ ). Essas proteínas, por sua vez, fosforilam diferentes fatores de transcrição e outras cinases, como a cinase regulada por sinal extracelular (ERK) levando, entre inúmeros outros efeitos, à inibição da geração de mediadores inflamatórios, da expressão de CD40 e da fagocitose (Schulte & Fredholm, 2003; Serezani *et al.*, 2008).

Os receptores do grupo P2 são divididos em duas famílias, a P2X que são associados a canais iônicos e ativados pelo ATP, permitindo o influxo de cátions ( $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ ), segundo Burnstock *et al.* (2012) foram descritos 7 receptores, nomeados de P2X<sub>1-7</sub>, sendo divididos em três grupos de acordo com a afinidade por ATP. Grupo 1, que inclui P2X<sub>1</sub> e P2X<sub>3</sub>, possuem alta afinidade por ATP e são rapidamente ativados e desativados, já o grupo 2 inclui os receptores P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub> e P2X<sub>6</sub>, com menor afinidade pelo ATP e desativado mais lentamente. O grupo 3 incluindo o P2X<sub>7</sub>, com baixa afinidade pelo ATP (Burnstock *et al.*, 2012). A segunda família de receptores P2, nomeada P2Y, é constituída por 8 receptores distintos, P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>, e diferentemente dos P2X são associados a uma proteína G, podendo ser ativada por ATP, ADP e AMP, o principal sinal envolve a fosfolipase C, que leva à formação do inosito 1,4,5-trifosfato (InsP<sub>3</sub>) e a mobilização intracelular de cálcio (Burnstock *et al.*, 2012). A Figura 3 representa de forma esquemática a participação dos receptores purinérgicos e das enzimas CD39 e CD73 no metabolismo e ligação aos receptores.

Alguns compostos químicos são utilizados com a finalidade de se avaliar a participação desses receptores, como o 8-[4-[(4-Ciano)fenilcarbamoilmetil]oxi]fenil]-1,3-di-(n-propil)xantina (MRS 1754) e que tem como principal efeito induzir uma resposta pró-inflamatória, uma vez que é um potente antagonista dos receptores  $A_{2B}$ , e o 5'(N-Etilcarboxamido) adenosina (NECA) análogo à adenosina e antagonista dos receptores  $A_1$  e  $A_2$  e que tem como seu efeito dependente de sua concentração, semelhante ao observado para a adenosina, concentrações baixas induzem uma resposta pró-inflamatório pela ativação dos receptores  $A_1$  e concentrações elevadas uma resposta anti-inflamatória pela ativação dos receptores  $A_2$ . Nesse sentido, Darashchonak *et al.* (2014) demonstraram que a adição do MRS 1754 foi capaz de reduzir os níveis intracelulares de cAMP em células endoteliais, contrário a esse resultado a adição do NECA promoveu aumento de cAMP. van der Hoeven *et al.* (2008)

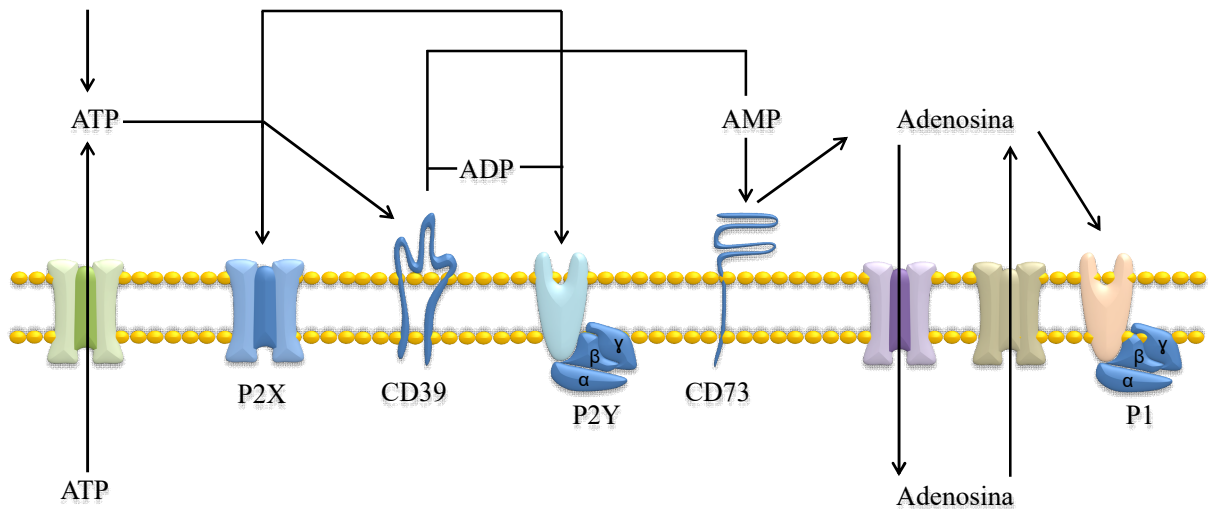
demonstraram que a produção do Superóxido, um ROS, em neutrófilos de C57BL/6 tratados com NECA apresentam perfil de produção dependente do estímulo utilizado. Um outro composto empregado é a Suramina, antagonista dos receptores P2X e P2Y, que tem como uma de suas funções desestabiliza-los, de modo que não seja possível a ligação ATP, ADP ou AMP, a esses receptores, de forma a reduzir os efeitos pró-inflamatórios dos mesmos. Pesanti (1978) e Sipka *et al.* (1991) observaram que a adição de Suramina em culturas de monócitos foram capazes de induzir a fagocitose de *Listeria monocytogenes* e *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente.

Mizumoto *et al.* (2002) mostraram que camundongos CD39 *knockout* apresentavam infiltrado leucocitário exacerbado após aplicação tópica de químicos que irritam a pele, sendo essa observação devido à redução da hidrólise de ATP no local da lesão. Corriden *et al.* (2008) mostraram que CD39 é expresso em neutrófilos, sendo uma importante enzima de hidrólise de ATP, além de possuir importância na migração dessas células em resposta a diferentes estímulos. Eltzhig *et al.* (2006) mostram que neutrófilos do sangue periférico de humanos expressam altos níveis de CD39, no entanto, neste trabalho, não foi detectado a expressão de CD73 por estas células. Considerando os estudos que abordam o papel de CD39 e CD73 em linfócitos, Deaglio *et al.* (2007) demonstraram que células T reguladoras fazem uso de adenosina, produzida pela ativação de CD39 e CD73 em sua superfície, para controlar a ativação de linfócitos T efetores. Yegutkin *et al.* (2011), analisando a participação da enzima CD73 no desenvolvimento de tumores, observaram que a aplicação de *Adenosine 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene)diphosphate* ( $\alpha\beta$ -metileno), análogo ao AMP porém que bloqueia a atividade da CD73, em camundongos portadores de melanoma, é capaz de retardar o crescimento de tumor, uma vez que esse bloqueio aumentou a degradação extracelular do ATP pela CD39.

A ativação dos receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> pela adenosina, na superfície de neutrófilos, faz com que essas células percam sua capacidade de adesão às células endoteliais. Estudos de Cronstein *et al.* (1992) e Ohta & Sitkovsky (2001) demonstraram a relação dos receptores de adenosina com a interação célula endotelial/neutrófilo, no qual, essa interação é suprimida na presença de agonistas do receptor A<sub>2A</sub>, e que houve uma resposta inflamatória exacerbada em animais A<sub>2A</sub><sup>-/-</sup> e em animais tratados com antagonista desse receptor. Além disso, foi observado que a ativação do receptor A<sub>1</sub> favorece à interação neutrófilo/endotélio. Chen *et al.* (2006) mostraram que neutrófilos humanos exploram a rápida e transitória liberação de ATP para amplificar sua migração em direção a um quimioatrativo via sinalização autócrina mediante os receptores P2Y<sub>2</sub> e A<sub>3</sub>. Esses autores demonstraram a importante participação dos



receptores purinérgicos na funcionalidade dos neutrófilos, e que dependendo de quais forem ativados, processos opostos podem ser desencadeados nessas células.



**Figura 3. Representação esquemática da membrana celular demonstrando o caminho percorrido pelo ATP até sua metabolização em adenosina, levando em consideração os pontos importantes para o presente trabalho.** O ATP presente no espaço extracelular, quer seja de fonte da própria célula ou de outra, poderá se ligar aos receptores P2X abrindo o canal iônico, ou se ligar à enzima CD39, que por sua vez, desfosforila o ATP em ADP ou AMP. O primeiro metabólito (ADP) se ligará aos receptores P2Y, dando início à sinalização principalmente via fosfolipase C, enquanto que o AMP tem como destino a enzima CD73. Nesse ponto a adenosina presente no espaço extracelular, independente de sua fonte, se ligará aos receptores P1, e dependendo da concentração irá induzir ou suprimir a ação da adenilato ciclase.

Desse modo, considerando os vários estudos relacionados à biologia dos neutrófilos e seu papel na infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, fica evidente o importante papel dessas células como componente da resposta inflamatória. Entretanto, ainda não está claro os mecanismos utilizados por neutrófilos para destruição e controle de parasitos do gênero *Leishmania*. De forma interessante, ainda é escassa a literatura acerca dos efeitos da presença de purinas extracelulares nos processos inflamatórios, especialmente no que diz respeito a infecção por protozoários. Deste modo, fica evidente a importância de se avaliar o efeito de purinas extracelulares na interação neutrófilo-*Leishmania*. Esta abordagem pretende contribuir para ampliar a compreensão dos mecanismos imunológicos advindos dos neutrófilos visando o melhor entendimento e o controle da infecção por parasitos do gênero *Leishmania*.

## 2 – JUSTIFICATIVA

A infecção por parasitos do gênero *Leishmania* causa uma série de manifestações clínicas, que podem variar dependendo da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro. A resposta inicial do hospedeiro a um patógeno é rapidamente gerada pela resposta imune inata que pode levar à eliminação do parasito. Considerando a importância e a participação de diferentes células da resposta imune inata na defesa do hospedeiro frente à infecção por *Leishmania*, cabe ressaltar que diversos trabalhos têm mostrado que os neutrófilos desempenham papel importante na morte deste parasito, contribuindo para o desenvolvimento da resposta imune adquirida e efetora. É importante salientar que a maior parte dos trabalhos aborda a infecção por *L. major* e, nesse sentido, é de grande relevância a abordagem proposta nesse trabalho a fim de ampliar os conhecimentos atuais sobre o papel de neutrófilos durante a infecção por outras espécies do gênero *Leishmania*. Em situações de injúria, como as causadas pelos parasitos do gênero *Leishmania*, o ATP é acumulado no meio extracelular e desempenha funções pró-inflamatórias. A participação de purinas extracelulares na regulação de processos imunológicos, bem como a participação das ecto-nucleotidases presentes na superfície de diferentes células, tem recebido muita atenção da comunidade científica nos últimos anos, sendo observado o seu papel na regulação da resposta imune. É importante ressaltar que os neutrófilos podem desempenhar um papel relevante na fase inicial da infecção por *Leishmania* e, que neste contexto, há uma escassez de trabalhos científicos sobre a participação das purinas. Diante deste cenário, o presente estudo pretende contribuir para ampliar o entendimento do papel dos neutrófilos, nos eventos iniciais da infecção pelas principais espécies dermatotrópicas da leishmaniose tegumentar (*L. amazonensis* e *L. braziliensis*), considerando a análise de diferentes receptores purinérgicos.

### **3 - OBJETIVO**

#### **3.1 – Objetivo Geral**

Avaliar o efeito de receptores purinérgicos em neutrófilos cultivados *in vitro* com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis*.

#### **3.2 – Objetivos Específicos**

Avaliar a infecção *in vitro* com *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* em neutrófilos, buscando estudar nessa população celular os seguintes parâmetros:

1. Viabilidade celular;
2. Interação entre neutrófilos e formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, em diferentes tempos de cultivo (1h, 2h e 3h);
3. Expressão das ecto-nucleotidases (CD39 e CD73);
4. Atividade das enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) e 5' nucleotidase;
5. Síntese de espécies reativas de oxigênio em diferentes condições de cultivo (MRS 1754,  $\alpha\beta$ -metileno, suramina e NECA);
6. Produção de óxido nítrico em diferentes condições de cultivo (MRS 1754,  $\alpha\beta$ -metileno, suramina e NECA).

## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - Animais**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 jovens (8-10 semanas), provenientes do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-MG. Os animais foram mantidos no Biotério de Ensaios Pré-Clínicos, lotado no Departamento de Morfologia-UFMG, em caixas de polisulfona de 20x32x21 cm (n=5/ caixa), contendo maravalha autoclavada, sendo fornecido água e ração à vontade. As trocas de forração e limpeza das caixas foram realizadas duas vezes por semana. Os experimentos tiveram início após um período de quarentena, no qual os animais receberam ivermectina (100µL; 0,2mg/Kg), em duas doses intervaladas de 15 dias, para então prosseguirem para a sala de experimentação em camundongos do Biotério de Ensaios Pré-Clínicos. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Protocolo nº. 265 / 2014 (Anexo 1).

### **4.2 - Obtenção e purificação de neutrófilos da medula óssea de camundongos C57BL/6**

Todo o processo de obtenção e purificação foi realizado em ambiente estéril, em Fluxo Laminar *SterilGARD Hood Class II Type A/B3* (Baker, Sanford, Maine, EUA). Após o procedimento de eutanásia, os fêmures, tíbias e úmeros de camundongos C57BL/6 foram retirados e imergidos em álcool 70°GL por 2 minutos, seguido de imersão em PBS-W (PBS 0,5% BSA 0,1% azida sódica, pH 7,2). Posteriormente, as epífises foram cortadas e com o auxílio de uma seringa de 20mL (Labor Import, Barueri, SP, Brasil) e agulha 26Gx1/2” (BD PrecisionGlide™, Franklin Lakes, NJ, EUA), 5mL de PBS-W foram injetados pelas extremidades. A suspensão celular foi coletada em tubo do tipo Falcon de 50 mL (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha), e então submetida a centrifugação à 300 xg, a 20°C, durante 8 minutos. O sobrenadante foi descartado, a suspensão celular foi ressuspensa em 10mL de PBS-W, e submetida a centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 2mL de PBS-W e aplicadas sobre o gradiente de Ficoll®.

Deste modo, o gradiente de Ficoll® foi preparado conforme descrito por Viana (2013), com pequenas alterações. Primeiramente, em um tubo cônico de polipropileno de 15mL (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha) foram adicionados 4mL de Ficoll 1119 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), seguido de 4mL de Ficoll 1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO,

EUA). Sobre o Ficoll 1077, adicionou-se 2mL da suspensão de células da medula óssea. A suspensão foi centrifugada a 300 xg, a 22°C, durante 35 minutos. A fração de neutrófilos foi obtida na interface dos gradientes 1119 e 1077, sendo transferidos para um tubo do tipo Falcon de 15mL. Os neutrófilos foram lavados em 10mL de PBS-W por centrifugação a 300 xg, a 4°C durante 8 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspenso em 5mL de solução de lise (NH<sub>4</sub>Cl) e incubado por 10 minutos, mantidos a 4°C. Posteriormente, foram adicionados 5mL de PBS tamponado (0,5% de BSA, 2 mM de EDTA) e as amostras foram centrifugadas a 300 xg, 4°C, durante 7 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspenso em 10mL de PBS tamponado (pH 7,2) e submetidas à centrifugação nas condições anteriormente citadas. Novamente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspenso em 1mL PBS tamponado (pH 7,2) para contagem celular.

Para a seleção positiva das células em coluna magnética, utilizou-se o protocolo fornecido pela Miltenyi Biotec (Rochester, NY, EUA), com pequenas modificações. Após contagem as células foram centrifugadas a 300 xg, 4°C, durante 7 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspenso de 50µL de PBS tamponado (pH 7,2) para cada 15x10<sup>6</sup> neutrófilos. Após a ressuspenso, adicionou-se 10µL de anticorpo anti-Ly-6G-Biotin (Miltenyi Biotec Rochester, NY, EUA). Após 10 minutos de incubação, foram adicionados 20µL de anticorpo anti-Biotin Microbeads (Miltenyi Biotec Rochester, NY, EUA). Após 15 minutos de incubação, as células foram submetidas a centrifugação de 300 xg, 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* ressuspenso em 100µL de PBS tamponado (pH 7,2) para cada 15x10<sup>6</sup> neutrófilos e reservado, a 4°C, para passagem na coluna magnética. As colunas magnéticas (Miltenyi Biotec Rochester, NY, EUA) foram fixadas no magneto (Miltenyi Biotec Rochester, NY, EUA) e adicionou-se 2 mL de PBS tamponado (pH 7,2) (1mL por vez) para ajuste do fluxo de saída, em forma de gotejamento. Após o ajuste do fluxo, as células reservadas foram adicionadas à coluna magnética, na qual os neutrófilos ficaram aderidos pelas Microbeads. Após a saída total do volume, em que as células estavam suspensas, foram adicionados 4 mL de PBS tamponado (pH 7,2) à coluna magnética (1mL por vez), para a remover as células não aderidas, essas células foram coletadas em tubos poliestireno de 5mL e descartadas. Posteriormente, para obtenção das células fixadas à coluna magnética, a mesma foi retirada do magneto e lavada com 5mL de PBS tamponado (1mL por vez), com auxílio do êmbolo móvel que acompanha a coluna magnética.

Os neutrófilos obtidos após as etapas de purificação, foram ressuspenso em 1mL de Meio Completo para Células e Tecidos (CTCM), constituído de RPMI (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de SFB inativado (ThermoFisher Scientific, Life

Technologies, Waltham, MA, EUA), L-glutamina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) 2mM, penicilina G (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) 100 U/mL, 50 µM de mercaptoetanol (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suíça) e HEPES 25mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), (pH 7,2). A contagem do número total de células foi realizada em Câmara de *Neubauer* e visualizada por microscopia óptica. Os neutrófilos foram reservados a 4°C para posterior cultivo.

### 4.3 – Cultura de Parasitos

Promastigotas de *L. (Leishmania) amazonensis*, cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8) e *L. (Viannia) braziliensis*, cepa M2903 (MHOM/BR/75/M2903) foram cultivadas, na proporção de  $1 \times 10^5$  Leishmanias/mL em placas de 24 poços (ThermoFisher Scientific, NUNC, Waltham, MA, EUA) em 2mL de *Grace's Insect Medium* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – LGC, Cotia, SP, Brasil) inativado, L-glutamina (Gibco BRL, Grand Island, NY, EUA) 2mM e penicilina G (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) 100 U/mL, pH 6,5, e mantidas em estufa BOD TE-371 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) à 25°C. Promastigotas em fase estacionária foram obtidas após 5 dias de cultivo em meio *Grace's* (Afonso & Scott, 1993), após serem lavadas em tubos tipo Falcon de 15 mL duas vezes com PBS (pH 7,2) e submetidas a centrifugação (Sorval RT6000b, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) à 1540 xg, a 4°C, durante 10 minutos. Os parasitos obtidos foram ressuspensos em 1mL de CTCM para contagem do número total de promastigotas em Câmara de *Neubauer*, em microscópio óptico, e reservados em estufa BOD para posterior utilização.

### 4.4 - Preparação do estímulo inespecífico zimosan

O zimosan A (Sigma-Aldrich) é formado por um complexo proteína-carboidrato obtido da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O zimosan A induz perfil pró-inflamatório em células da resposta imune inata (Macrae & Pryzwansky, 1984) levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio sendo também, utilizado como controle positivo de fagocitose (Vasconcelos *et al.*, 2012; Takeuchi *et al.*, 2012). Nesse sentido, o zimosan A foi utilizado como controle positivo

nos experimentos de expressão e atividade das enzimas CD39 e CD73, bem como nos experimentos de espécies reativas do oxigênio e óxido nítrico. O zimosan foi preparado conforme descrito por Nuutila & Lilius (2005), com pequenas modificações. Deste modo, 100mg de zimosan foi adicionada em tubo tipo Falcon de 50mL e diluído em 5mL de PBS (pH 7,2) e submetido a aquecimento de 90°C em estufa (Thelco *Model 17, Precision Scientific* PS, Buffalo, NY, EUA) por 30 minutos. A suspensão foi submetida à centrifugação (Beckman, Model J-6B, EUA) a 11 x g, 25°C, durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 20 mL de PBS (pH 7,2). Posteriormente, a solução foi armazenada em freezer -80°C (*Ultra Low Temperature Freezer*, Eppendorf, New Brunswick Scientific, Hauppauge, NY, EUA) em alíquotas de 1 mL na concentração de 80 mg/mL.

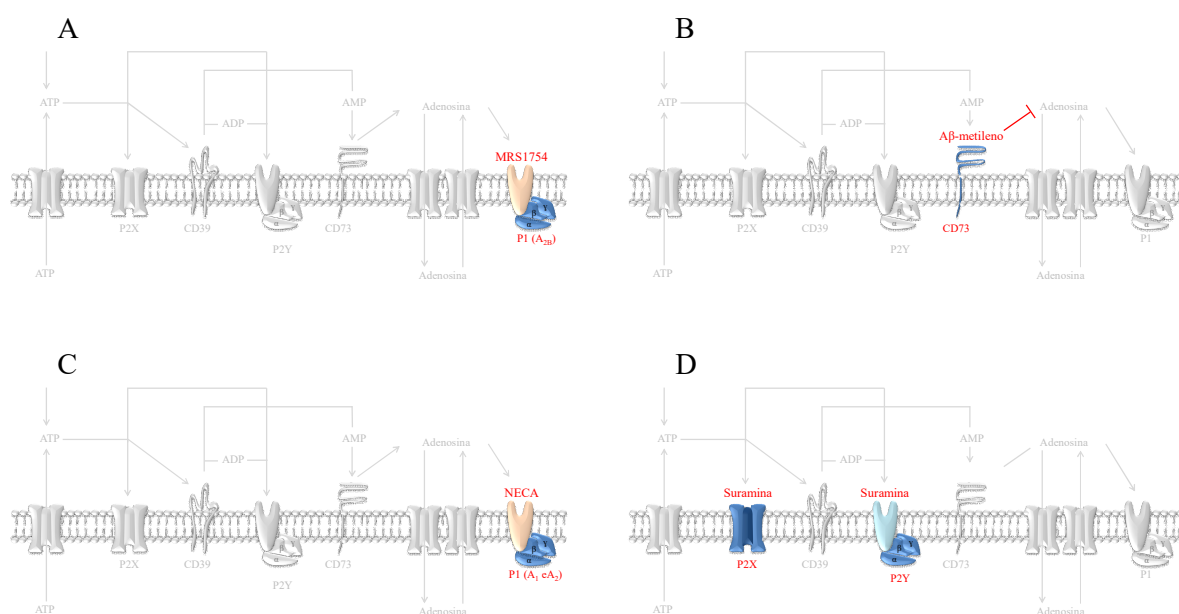
Para promover e facilitar o processo de fagocitose, o zimosan foi opsonizado utilizando soro de camundongos C57BL/6 não infectados, conforme descrito por Lovrien *et al.* (1989), com pequenas modificações. Deste modo, 250 µL de zimosan (20mg/mL) foram diluídos em 750 µL PBS (pH 7,2) e submetido a centrifugação à 11 xg, 25°C, durante 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 200 µL de soro autólogo fresco e 800 µL de PBS (pH 7,2). A solução foi incubada por 30 minutos em banho-maria (VWR 1220, VWR International, Radnor, PA, EUA) a 37°C, e agitada por inversão em intervalos de 10 minutos. Posteriormente, a solução foi submetida a nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em 1 mL de PBS (pH 7,2).

#### **4.5 – Cultivo de neutrófilos na presença de promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ou zimosan A**

Os neutrófilos foram cultivados na presença ou ausência de promastigotas *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (na proporção de 5 parasitos por neutrófilo) e zimosan A (controle positivo para estimulação dos neutrófilos) (36µg/mL, correspondente a cinco partículas por célula) empregando-se tubos de polipropileno de 5mL (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA), separadamente. As culturas foram mantidas em CTCM, por 3 horas em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

Com o intuito de avaliar a possível participação dos receptores purinérgicos na síntese de ROS e NO, foram adicionados, separadamente, quatro compostos químicos, cada um com

um diferente alvo na superfície celular. O 8-[4-[[[(4-Ciano)fenilcarbamoilmetil]oxi]fenil]-1,3-di-(n-propil)xantina (MRS 1574) (5 $\mu$ M), um potente antagonista dos receptores A<sub>2B</sub>; o Adenosina 5'-( $\alpha,\beta$ -metileno) difosfato ( $\alpha,\beta$ -metileno) (200  $\mu$ M), um inibidor da CD73; o 5'(N-Etilcarboxamido) adenosina (NECA) (1 $\mu$ M), um potente agonista dos receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>; e a Suramina (200 $\mu$ M), uma antagonista dos receptores P2X e P2Y. Todos estes compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e obtidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A Figura 4 representa de forma esquemática o local de atuação dos tratamentos citados, bem como a estrutura química de cada composto. Foi adicionado, para cada estímulo, *Diphenyleneiodonium chloride* (DPI), inibidor da enzima NADPH, principal produtora de espécies reativas de oxigênio, e aminoguanidina (AG) inibidora específico de iNOS, produtora de óxido nítrico, separadamente, como controles da produção de ROS e NO, respectivamente.



**Figura 4. Representação esquemática da membrana celular demonstrando os receptores purinérgicos, bem como as enzimas CD39 e CD73, destacando os locais específicos de ligação dos tratamentos utilizados para avaliar a relação dos mesmos à síntese de ROS e NO.** A - representa o sítio de ligação do MRS 1574, antagonista do receptor A<sub>2B</sub>. B - representa a enzima inibida pelo  $\alpha,\beta$ -metileno. C - Sítio de ligação do NECA, agonista dos receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>. D - representa os receptores de ligação para suramina, antagonista dos receptores P2X e P2Y.



#### **4.6 - Avaliação da viabilidade de neutrófilos estimulados *in vitro* com promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A**

A viabilidade *in vitro* dos neutrófilos foi avaliada nas condições de cultivo com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ou zimosan A, e na presença dos tratamentos com MRS 1754, suramina,  $\alpha\beta$ -metileno, NECA, DMSO, DPI e AG, após 3 horas de cultivo. Deste modo, foi utilizado o corante Azul de Tripán para análise da viabilidade celular. O Azul de Tripán é um corante amplamente utilizado para corar tecidos ou células mortas, e seu mecanismo de ação consiste em possuir carga negativa que impede a interação com a célula, a não ser que a mesma possua danos em sua membrana. Após aplicação do corante, surge um contraste de cores, no qual as células coradas em azul são consideradas inviáveis, e consequentemente as células que não internalizam o Azul de Tripán são consideradas viáveis (Tran *et al.*, 2011).

A contagem de células viáveis foi realizada mediante contagem do número de células coradas e não coradas, visualizadas por microscópio óptico, com auxílio da câmera de Neubauer. Após contagem, o percentual de células vivas foi calculado a partir do número total de células (células coradas e não coradas).

#### **4.7 - Avaliação da interação entre neutrófilos e promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A**

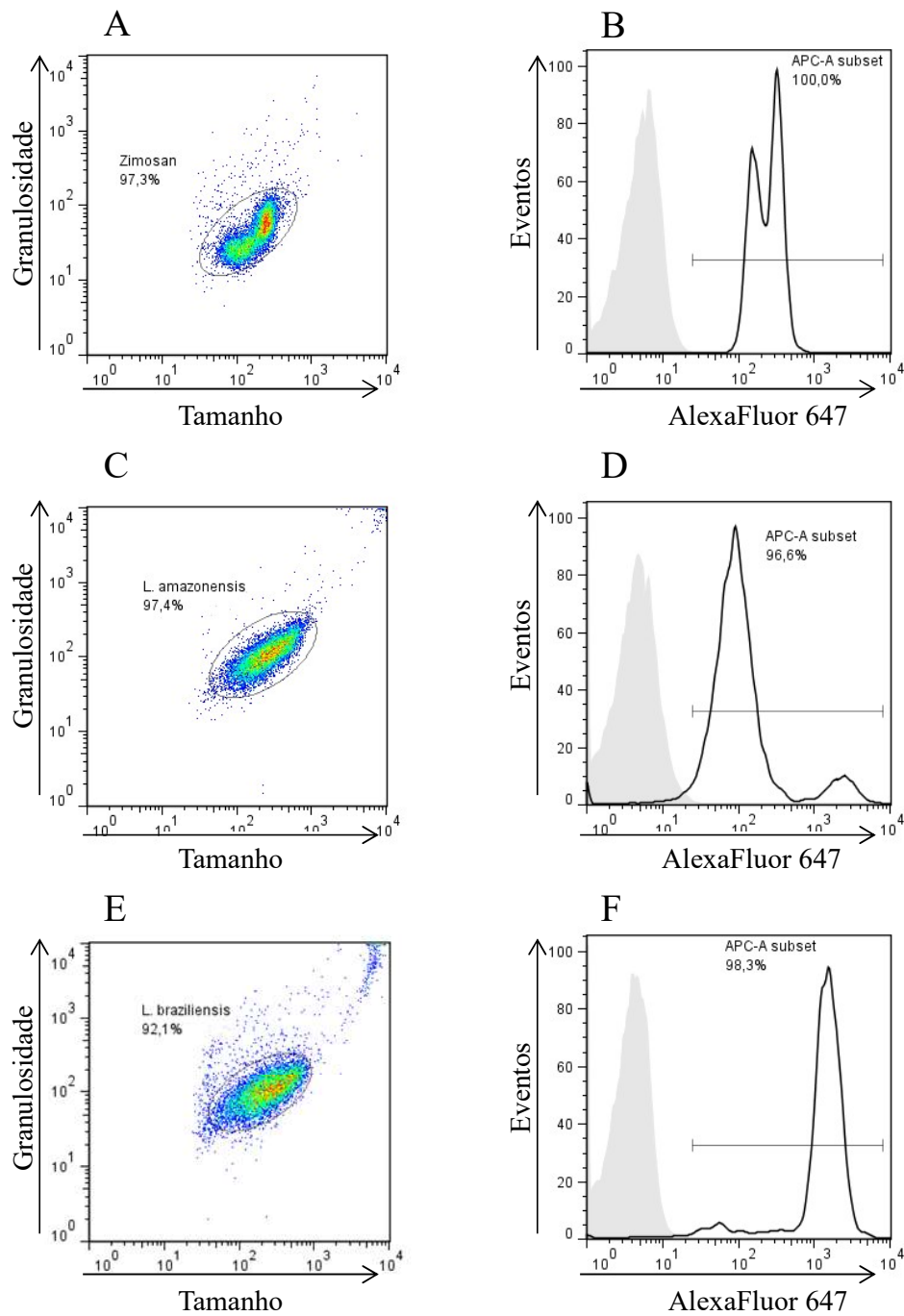
Para o ensaio da interação *in vitro* neutrófilos/estímulo (parasito ou zimosan) foram utilizadas promastigotas em fase estacionária, como descrito anteriormente. Os parasitos foram ressuspensos em tubo tipo Falcon de 15mL com PBS 5% SFB, pH 7,2, e ajustados na concentração de  $10^6$  parasitos/mL. Para a marcação das formas promastigotas de *Leishmania*, quantidades equivalentes de parasitos e da preparação do fluorocromo AlexaFluor 647 (ThermoFisher Scientific, Life Technologies, Waltham, MA, EUA) (1mL de parasitos na concentração de  $10^6$  parasitos/mL + 1mL de AlexaFluor 647 na concentração de 3,2 $\mu$ g/mL) foram incubados em tubos de polipropileno de 5mL por 30 minutos a 37°C em estufa 5% CO<sub>2</sub>. O estímulo inespecífico,  $10^6$  partículas zimosan A o equivalente a 120 $\mu$ L, foi marcado, com AlexaFluor 647, da mesma forma que a descrita para os parasitos. Após a incubação, foi realizada uma etapa de lavagem com 2mL de PBS-W e submetido a centrifugação em 480 x g, durante 10 minutos a 18°C com. Em seguida, após descartar o sobrenadante, o material foi

ressuspendido com 1 mL de CTCM. Uma alíquota foi separada para avaliação em citômetro de fluxo FACSCanthonII™-BD a fim de avaliar a intensidade de fluorescência apresentada pelos parasitos marcados com AlexaFluor 647. A qualidade da marcação foi avaliada através da intensidade média de fluorescência (IMF) dos parasitos marcados, com base no *overlay* dos histogramas, com o mínimo de 90% de marcação (Figura 5).

Neutrófilos foram cultivados em tubos de polipropileno de 5mL, contendo CTCM, na presença de promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ou zimosan A (marcados com AlexaFluor 647), mantidos por 1, 2 e 3 horas em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, as culturas foram lavadas com 2 mL de PBS-W em centrifugação de 300 x g durante 7 minutos a 4°C. Os tubos foram vertidos e o *pellet* ressuspendido e transferido para tubos de poliestireno de 5 mL (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 20µL dos anticorpos anti-Ly-6G-FITC (diluído 1:1000 em PBS-W) e anti-CD11b-PE (diluído 1:3000 em PBS-W) (Tabela 1). Os tubos foram homogeneizados em vortex e mantidos por 30 minutos ao abrigo de luz. As amostras foram novamente lavadas em 2 mL de PBS-W por centrifugação a 300 xg, durante 7 minutos a 4°C. Após lavagem, os tubos foram vertidos e a suspensão celular ressuspendida em 200 µL de solução fixadora (Facs Lysing Solution – BD Bioscience). Para aquisição dos dados foram obtidos 30.000 eventos totais utilizando o citômetro de fluxo FACSCanthonII™-BD, software DIVA™.

| <b>Marcador</b> | <b>Marca</b> | <b>Fluorocromo</b> | <b>Clone</b> | <b>Função</b>                      |
|-----------------|--------------|--------------------|--------------|------------------------------------|
| Anti-Ly-6G      | eBioscience  | APC e FITC         | RB6-8C5      | Marcador de neutrófilos            |
| Anti-CD11b      | eBioscience  | PE e FITC          | M1/70        | Molécula de adesão de granulócitos |
| Anti-CD39       | eBioscience  | eFluor660          | 24DMS1       | E-NTPDase                          |
| Anti-CD73       | eBioscience  | PE                 | AD2          | 5' nucleotidásica                  |

**Tabela 1:** Anticorpos utilizados para avaliação de marcadores de superfície



**Figura 5. Marcação de zimosan A, *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* com AlexaFluor 647.** A - Perfil de distribuição em gráfico de tamanho *versus* granulosidade para selecionar a população de zimosan. B - Histograma referente à sobreposição (*overlay*) da população celular selecionada pelo *gate* no gráfico A, no qual o histograma preenchido em cinza representa o zimosan não marcado com AF 647 e o histograma sem preenchimento representa o zimosan marcado com AF 647. C - Perfil de distribuição em gráfico de tamanho *versus* granulosidade para selecionar a população de *L. amazonensis*. D - Histograma referente à sobreposição (*overlay*) da população celular selecionada pelo *gate* no gráfico C, no qual o histograma preenchido em cinza representa *L. amazonensis* não marcado com AF 647 e o histograma sem preenchimento representa *L. amazonensis* marcado com AF 647. E - Perfil de distribuição em gráfico de tamanho *versus* granulosidade para selecionar a população de *L. braziliensis*. F - Histograma referente à sobreposição (*overlay*) da população celular selecionada pelo *gate* no gráfico e, no qual o histograma preenchido em cinza representa *L. braziliensis* não marcado com AF 647 e o histograma sem preenchimento representa *L. braziliensis* marcado com AF 647.

#### **4.8 - Avaliação da expressão das ecto-nucleotidasas CD39 e CD73 por neutrófilos cultivados *in vitro* com promastigotas de *Leishmania amazonenses* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A**

Neutrófilos foram cultivados conforme descrito no item 4.5. Após o cultivo, as células foram lavadas em tubos de polipropileno de 5mL por centrifugação em 2mL de PBS-W a 300 xg durante 8 minutos. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuscitado e as células transferidas para dois tubos de poliestireno de 5mL, sendo o primeiro tubo com 20µL dos anticorpos anti-Ly-6G-FITC (diluição 1:1000), anti-CD11b-PE (1:3000) e anti-CD39-eFluor660 (1:100). No segundo tubo, foram empregados 20µL dos anticorpos anti-Ly-6G-APC (1:3000) e anti-CD11b-FITC (1:2000) e 1µL do anti-CD73-PE. Os tubos foram homogeneizados em vortex e incubados por 30 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, foram adicionados 2 mL de PBS W e as amostras foram centrifugadas a 300 xg durante 8 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 200µL de solução fixadora (FACS Lysing Solution – BD Biosciences). Para aquisição dos dados foram obtidos 30.000 eventos totais utilizando o citômetro de fluxo FACSCantoII™-BD, pelo software DIVA™.

#### **4.9 - Determinação da atividade enzimática da ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) e 5' nucleotidase de neutrófilos cultivados *in vitro* com promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A**

As células foram cultivadas conforme descrito no item 4.5. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes, tubos de polipropileno de 15mL (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) com 5mL de solução salina 0,9% (0,9% NaCl, pH=7) a 300 xg durante 8 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 500µL da solução 5% HEPES 1M, 5% Tris 1M, 2,9% NaCl 4M, 0,27% KCl 2M, 0,25% Glicose 2,22 M e 86,58% água milli-Q, pH 7,2, e a concentração final de células foi ajustada para  $5 \times 10^4$  neutrófilos/25 µL, após contagem em câmara de Neubauer.

Os ensaios para a análise de hidrólise do ATP, ADP e AMP foram realizados pela incubação de  $5 \times 10^4$  neutrófilos por 1 hora a em banho-maria 30°C, com 100µL da solução tampão de reação 5x (25% HEPES 1M, 25% Tris 1M, 14,5% NaCl 4M, 1,35% KCl 2M,

1,25% Glicose 2,22 M, 2,5% MgCl<sub>2</sub> 1M e 32,9 água milli-Q, pH 7,2) contendo 2 mM de ATP ou 2 mM de ADP ou 2 mM de AMP (Sigma- Aldrich, St Louis, MO, EUA). A reação foi interrompida pela adição de 125 µL de HCl 0,2 N (Meyer- Fernandes *et al.* 1997). A presença de hidrólise não específica foi determinada pela adição de 5x10<sup>4</sup> neutrófilos (25µL), obtidos previamente, após a reação ser interrompida.

As suspensões foram centrifugadas a 210 xg durante 10 minutos, 40 µL do sobrenadante foram transferidos para placa de 96 poços (ThermoFisher Scientific, NUNC, Waltham, MA, EUA), para quantificação do Pi liberado. Foram adicionados, na mesma placa, 50µL de diferentes concentrações de soluções de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, para construção da curva padrão, nas seguintes concentrações de Pi: 22,5nmol Pi, 1,25nmol Pi, 5,62nmol Pi, 2,8nmol Pi, 1,4nmol Pi, 0,7nmol Pi, 0,35nmol Pi e 0,17nmol Pi. Aos foram adicionados 120µL, 110µL e 160µL da solução 5% HEPES 1M, 5% Tris 1M, 2,9% NaCl 4M, 0,27% KCl 2M, 0,25% Glicose 2,22 M e 86,58% água milli-Q, pH 7,2, aos poços destinados ao sobrenadante da atividade enzimática, ao padrão e ao branco, respectivamente. Para a detecção de Pi, adicionou-se aos poços descritos anteriormente, 40µL uma mistura contendo uma parte de molibdato de amônio (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) 10% diluído em HCl (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) 4N, para três partes de verde de malaquita (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) 4N, para três partes de verde de malaquita (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) 0,2% diluído em HCl 4N. A quantificação do Pi liberado foi realizada após 10 minutos de incubação, a 25°C, por leitura em espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale CA, EUA), em comprimento de onda de 650 nm (Ekman & Jager, 1993). Por fim, a atividade enzimática, indiretamente determinada pela quantidade de Pi liberado, foi calculada pela subtração da hidrólise não específica, e utilizando-se da curva padrão de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, os valores foram ajustados para a detecção de nmol Pi gerados por 10<sup>6</sup> células/ hora.

#### **4.10 - Avaliação da expressão de espécies reativas do oxigênio por neutrófilos cultivados *in vitro* com promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A**

A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizada utilizando o Kit Image-iT™ *LIVE Green Reactive Oxygen Species* (Invitrogen®) que permite a detecção de ROS intracelular por citometria de fluxo. A técnica utiliza um marcador fluorogênico não fluorescente, o (5-ou-6)-carboxy-2'7' dichlorodihydro fluorescein diacetate (*carboxy-H2DCFDA*), que quando clivado por esterases intracelulares não específicas, origina

a molécula *carboxy-DCFH* que é susceptível a reagir com as ROS não específicas, tornando-se fluorescente. A inibição da produção de ROS foi realizada através do bloqueio da enzima NADPH oxidase. O *Diphenyleneiodonium chloride* (DPI) é capaz de inibir a enzima NADPH oxidase que é a principal produtora de espécie reativa de oxigênio intracelular (Osaki et al., 2011).

Além das condições de cultivo que foram descritas no item 4.5, foi adicionado 20µL de *Diphenyleneiodonium chloride* (DPI) (10mM) aos tubos de polipropileno contendo neutrófilos na presença de promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ou de zimosan A, separadamente. Posterior à incubação, as culturas foram lavadas com 2 mL de PBS-W em centrifugação de 300 x g durante 7 minutos a 4°C. Os tubos foram vertidos e o *pellet* ressuspenso e transferido para tubos de poliestireno contendo 20µ dos anticorpos anti-Ly-6G-APC (diluído 1:3200 em PBS-W), anti-CD11b-PE (diluído 1:3000 em PBS-W) e 20µM de *carboxy-H2DCFDA*. Em seguida, os tubos foram homogeneizados em vortex e mantidos por 30 minutos ao abrigo de luz. As amostras foram novamente lavadas em 2mL de PBS-W por centrifugação a 300 xg, durante 7 minutos a 4°C. Após lavagem, os tubos foram vertidos e a suspensão celular ressuspenso em 200µL de solução fixadora (Facs Lysing Solution – BD Bioscience). Para aquisição dos dados foram obtidos 30.000 eventos totais utilizando o citômetro de fluxo FACSCanthonII™-BD, pelo software DIVA™.

#### **4.11 - Detecção da produção de óxido nítrico por neutrófilos estimulados com promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A**

Kojima *et al.* (1998) desenvolveram um reagente permeável à membrana celular que permite a determinação dos níveis de NO intracelular por citometria de fluxo, denominado diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2 DA). A determinação do NO intracelular por citometria de fluxo baseia-se na capacidade do NO em oxidar o reagente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), que não é fluorescente, para uma forma fluorescente. Assim, resumidamente, o DAF-2 DA é convertido a 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) por meio da ação de esterases intracelulares. O DAF-2 não é permeável à membrana celular permanecendo, portanto, no interior das células. Em pH fisiológico, o DAF-2 é relativamente não fluorescente. No entanto, na presença de NO e oxigênio, um produto fluorescente é formado, o triazolofluoresceína (DAF-2T). A medida da fluorescência é feita pela leitura da

amostra no citômetro de fluxo e é proporcional à concentração de NO nas células (Havenga *et al.*, 2001; Strijdom *et al.*, 2004; Schachnik *et al.* 2008).

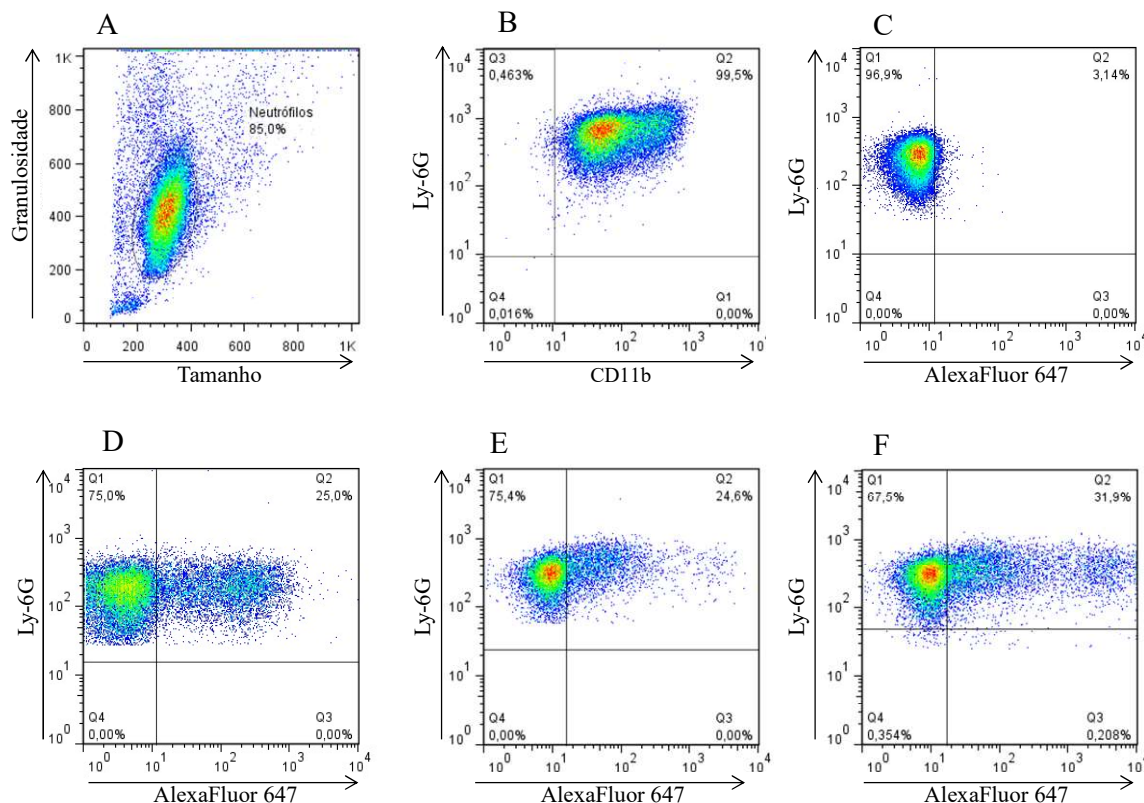
Além das condições de cultivo que foram descritas no item 4.5, foi adicionado a aminoguanidina (AG) (1M) em tubos de polipropileno de 5mL contendo neutrófilos na presença de promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* ou de zimosan A, separadamente. Após a incubação as culturas foram lavadas com 2 mL de PBS-W em centrifugação de 300 xg durante 7 minutos a 4°C. Os tubos foram vertidos e o *pellet* ressuspenso e transferido para tubos de poliestireno 5mL contendo 20µL dos anticorpos anti-Ly-6G-APC (diluído 1:3200 em PBS-W) e anti-CD11b-PE (diluído 1:3000 em PBS-W). Os tubos foram homogeneizados em vortex e mantidos por 30 minutos ao abrigo de luz. As amostras foram novamente lavadas em 2 mL de PBS-W por centrifugação a 300 xg, durante 7 minutos a 4°C. Após lavagem, os tubos foram vertidos e a suspensão celular ressuspenso em 200µL de solução fixadora (Facs Lysing Solution – BD Bioscience). Para aquisição dos dados foram obtidos 30.000 eventos totais utilizando o citômetro de fluxo FACSCantoII™-BD, pelo software DIVA™.

## 4.12 – Estratégias de Análise

### 4.12.1 - Análise da interação de neutrófilos em cultivo com promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A

Para análise do perfil de interação de neutrófilos na presença de promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A, foi utilizado o *software* FlowJo (*Flow Cytometry Analysis Software*, versão 7.6.5). Os neutrófilos purificados em coluna magnética foram selecionados por suas características morfométricas, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (Figura 6A). Após a seleção da população de interesse (Neutrófilos), foram avaliadas as características imunofenotípicas, em gráfico de Ly-6G-FITC *versus* CD11b-PE (Figura 6B). A interação neutrófilos/estímulo foi realizada através da construção de gráficos de Ly-6G-FITC *versus* AlexaFluor 647 (a seleção teve como controle o posicionamento dos *gates* conforme Figura 6C), representada pelas Figuras 6D, E e F, a interação entre neutrófilos e zimosan A ou

*L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, respectivamente. Os dados foram avaliados como percentual de neutrófilos Ly-6G-FITC+ AlexaFluor 647+.



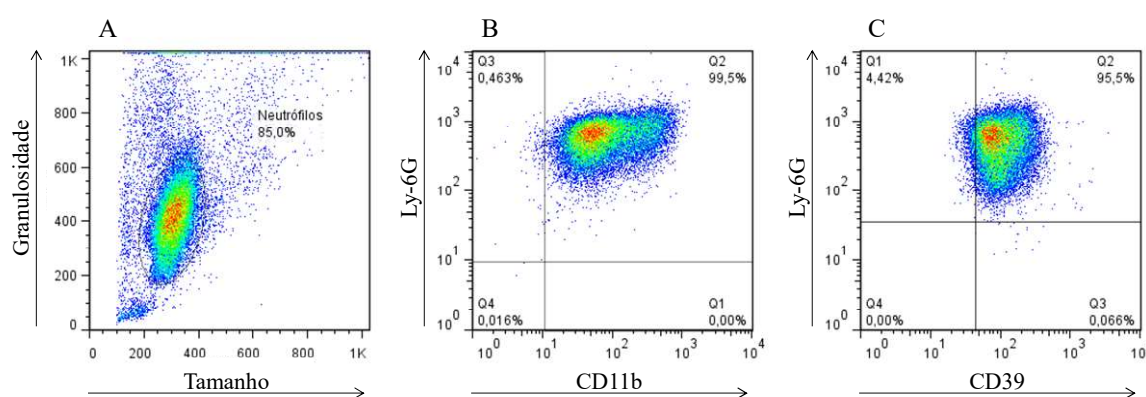
**Figura 6. Estratégia de análise referente ao perfil de interação de neutrófilos com *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A.** A - Perfil de distribuição celular em gráficos de tamanho (FSC) versus SSC (granulosidade). B - Perfil de distribuição celular de fluorescência 1 (Ly-6G-FITC) versus fluorescência 2 (CD11b-PE) da população selecionada no gate neutrófilos do gráfico A. C - Perfil de distribuição celular na ausência do corante AlexaFluor 647, em gráfico de Ly-6G-FITC versus AlexaFluor 647 da população selecionada no Q2 do gráfico B, utilizado para seleção da neutrófilos. D - Perfil de interação neutrófilos/zimosan A em gráfico de Ly-6G-FITC versus AlexaFluor 647 da população selecionada no Q2 do gráfico B. E - Perfil de interação neutrófilos/ *L. amazonensis* em gráfico de Ly-6G-FITC versus AlexaFluor 647 da população selecionada no Q2 do gráfico B. F - Perfil de interação neutrófilos/ *L. braziliensis* em gráfico de Ly-6G-FITC versus AlexaFluor 647 da população selecionada no Q2 do gráfico B. O percentual de interação neutrófilos/ estímulos foi obtido a partir do quadrante 2 (Q2) dos gráficos D, E e F, referente as condições de cultivo com zimosan A, promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente .

#### 4.12.2 - Análise da expressão das enzimas CD39 e CD73 por neutrófilos em cultivo com promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A

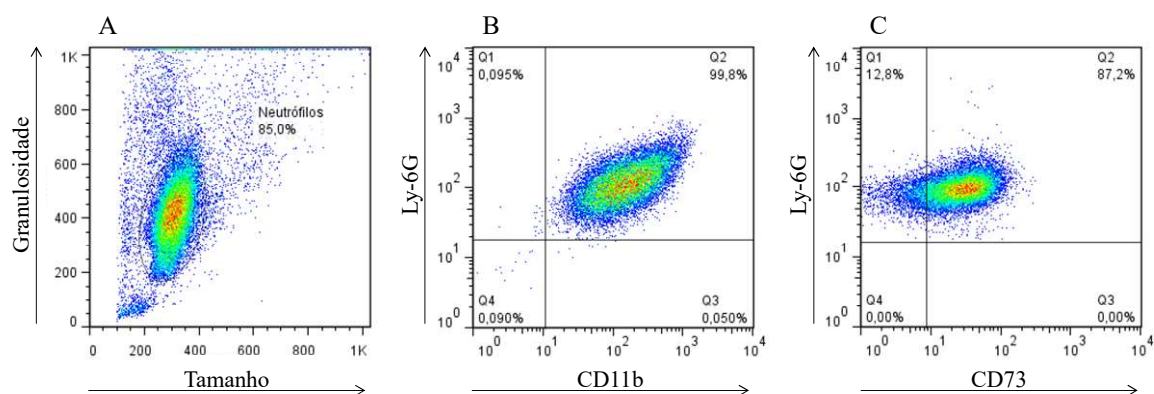
Para análise do perfil de expressão de CD39 e CD73 por neutrófilos estimulados, foi utilizado o software FlowJo (*Flow Cytometry Analysis Software*, versão 7.6.5). Os neutrófilos foram selecionados por suas características morfológicas, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) (Figura 7 e 8-A). Após a seleção da



população de interesse (neutrófilos), foram avaliadas as características imunofenotípicas em gráfico de fluorescência 1 (Ly-6G-FITC) *versus* fluorescência 2 (CD11b-PE) (Figura 7-B), e fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 1 (CD11b-FITC) (Figura 8-B). A expressão de CD39 foi realizada através da construção de gráficos de fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 1 (CD39-eFluor660) (Figura 7-C), e expressão de CD73 através da construção de gráficos de fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 2 (CD73b-PE) (Figura 8-C). Para os dados referentes à expressão de CD39 foi avaliado o percentual de neutrófilos Ly-6G-FITC+ CD39-eFluor660+, bem como a IMF de CD39-eFluor660. Para os dados referentes à expressão de CD73 foi avaliado o percentual de neutrófilos Ly-6G-APC+ CD73-PE+, bem como a IMF de CD73-PE.



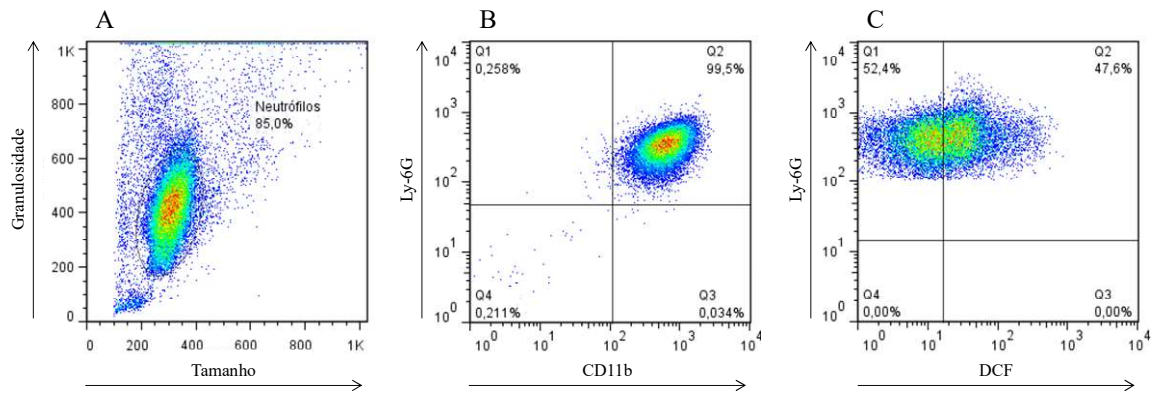
**Figura 7. Avaliação do perfil de expressão de CD39 em neutrófilos de medula óssea.** A - Perfil de distribuição celular em gráficos de tamanho (FSC) *versus* SSC (granulosidade). B - Perfil de distribuição celular de fluorescência 1 (Ly-6G-FITC) *versus* fluorescência 2 (CD11b-PE) da população selecionada no *gate* neutrófilos do gráfico A. C - Perfil de distribuição celular de fluorescência 1 (Ly-6G-FITC) *versus* fluorescência 4 (CD39-eFluor660) da população selecionada no Q2 do gráfico B. A expressão de CD39 foi obtido a partir do quadrante 2 (Q2).



**Figura 8. Avaliação do perfil de expressão de CD39 em neutrófilos de medula óssea.** A - Perfil de distribuição celular em gráficos de tamanho (FSC) *versus* SSC (granulosidade). B - Perfil de distribuição celular de fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 1 (CD11b-FITC) da população selecionada no *gate* neutrófilos do gráfico A. C - Perfil de distribuição celular de fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 2 (CD73-PE) da população selecionada no Q2 do gráfico B. A expressão de C39 foi obtido a partir do quadrante 2 (Q2).

#### 4.12.3 - Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos em cultivo com promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A

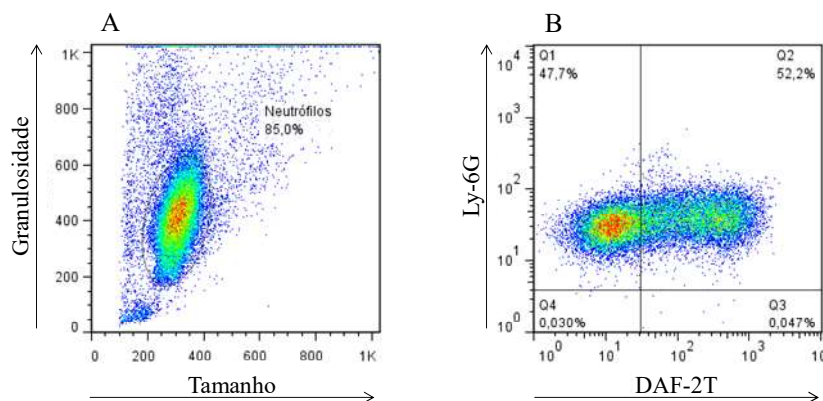
Para análise do perfil de expressão de NO por neutrófilos estimulados, foi utilizado o *software* FlowJo (*Flow Cytometry Analysis Software*, versão 7.6.5). Os neutrófilos foram selecionados por suas características morfométricas, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). Após a seleção da população de interesse (Neutrófilos) (Figura 9-A), foi realizada análise através de suas características imunofenotípicas, em gráfico de fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 1 (CD11b-PE) (Figura 9-B). A produção de espécies reativas de oxigênio intracelular foi realizada através da construção de gráficos de fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 1 (DAF-2T) (Figura 9-C). Os dados foram avaliados como o percentual de neutrófilos Ly-6G-APC+ DCF+.



**Figura 9. Avaliação do perfil de expressão intracelular de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos de medula óssea.** A - Perfil de distribuição celular em gráficos de tamanho (FSC) *versus* SSC (granulosidade). B - Perfil de distribuição celular de fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 2 (CD11b-PE) da população selecionada no *gate* neutrófilos do gráfico A. C - Perfil de distribuição celular de fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 1 (DCF) da população selecionada no Q2 do gráfico B. A expressão de ROS foi obtido a partir do quadrante 2 (Q2).

#### 4.12.4 – Análise da síntese de óxido nítrico por neutrófilos em cultivo com promastigotas de *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* ou zimosan A

Para análise do perfil de expressão de NO por neutrófilos estimulados, foi utilizado o *software* FlowJo (*Flow Cytometry Analysis Software*, versão 7.6.5). Os neutrófilos foram selecionados por suas características morfométricas, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). Após a seleção da população de interesse (Neutrófilos) (Figura 10-A), foi possível avaliar a expressão de óxido nítrico intracelular através da construção de gráficos de fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 1 (DAF-2T) (Figura 10-B). Os dados foram avaliados como o percentual de neutrófilos Ly-6G-APC<sup>+</sup> DAF2T<sup>+</sup>.



**Figura 10. Avaliação do perfil de expressão intracelular de óxido nítrico em neutrófilos de medula óssea.** A - Perfil de distribuição celular em gráficos de tamanho (FSC) *versus* SSC (granulosidade). B - Perfil de distribuição celular de fluorescência 4 (Ly-6G-APC) *versus* fluorescência 1 (DAF-2T) da população selecionada no *gate* neutrófilos do gráfico A. A expressão de NO foi obtido a partir do quadrante 2 (Q2).

#### 4.13 - Análise estatística dos dados

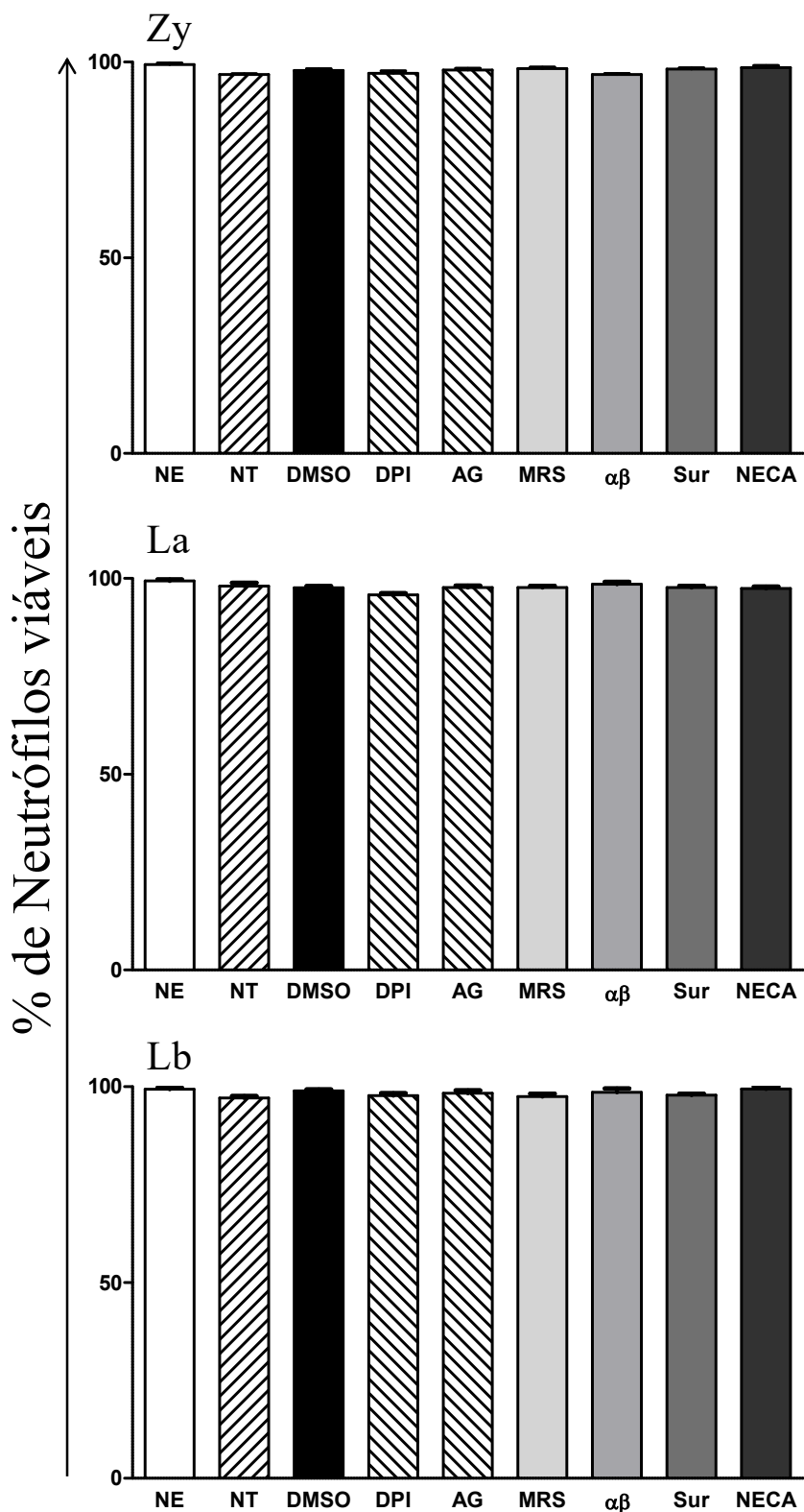
As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Graph Pad Prism 5.0 (San Diego, CA, EUA). A normalidade dos dados foi demonstrada pelo teste Kolmogorov-Smirnoff. Deste modo, foram empregados testes de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para avaliação entre as diferentes condições de cultivo. Diferenças estatisticamente significativa foram consideradas quando o valor de  $p$  foi inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram apresentados em gráficos de barra, demonstrando os valores da média e do erro padrão.

## 5. RESULTADOS

Os resultados descritos a seguir estão relacionados a diferentes condições de cultivo de neutrófilos, estimulados o não com zimosan (Zy), *L. amazonensis* (La) ou *L. braziliensis* (Lb). Além disto, os neutrófilos estimulados com Zy, La ou Lb, foram submetidos a diferentes condições de tratamentos, como: ausência de tratamento específico, ou tratados com: MRS 1754 (antagonista dos receptores A<sub>2B</sub>);  $\alpha\beta$ -metileno (bloqueador da CD73); suramina (antagonista dos receptores P2X e P2Y); NECA (agonista dos receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>); DMSO (controle usado para diluir os reagentes); DPI/AG (controle usado para inibir a NADPH oxidase e iNOS, respectivamente). Os resultados estão ilustrados na forma de gráficos de barras com valores de média e desvio padrão.

### 5.1 - Avaliação da viabilidade de neutrófilos na presença de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* ou zimosan A

A Figura 11 representa a viabilidade dos neutrófilos na presença de *L. amazonensis* (La), *L. braziliensis* (Lb) ou zimosan (Zy). Foi verificado que os diferentes tratamentos utilizados no cultivo de neutrófilos (MRS 1574,  $\alpha\beta$ -metileno, Suramina e NECA) não afetaram a viabilidade das células bem como os controles usados para diluir os reagentes (DMSO) ou inibir a NADPH oxidase (DPI) e a enzima óxido nítrico sintase (AG).

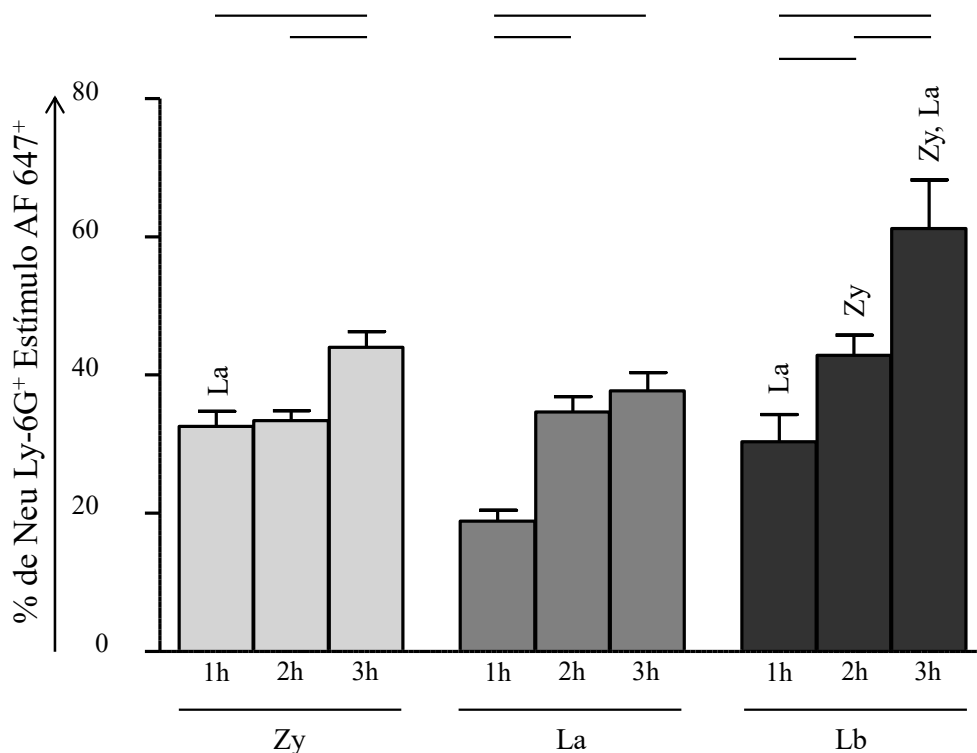


**Figura 11. Avaliação da viabilidade celular de neutrófilos na presença de promastigotas de *L. amazonensis* (La), *L. braziliensis* (Lb) ou zimosan (Zy).** Diferentes condições de cultivo foram avaliadas, entre as quais: neutrófilos não estimulados com Zy, La ou Lb (NE; □); ou neutrófilos estimulados com Zy, La e Lb, na ausência de tratamento [neutrófilos não tratados (NT; ▨)] ou tratados com: DMSO (DMSO; ■); *Diphenyleiodonium chloride* (DPI; ▩) ou aminoguanidina (AG; ▧). MRS 1754 (MRS, □); αβ-metileno (αβ; ▨); suramina (Sur; ▩); NECA (NECA, ■); Os resultados estão apresentados em gráficos de barra com valores de média e desvio padrão, como percentual de neutrófilos viáveis.

## 5.2 - Avaliação da interação entre neutrófilos na presença de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* ou zimosan A

A Figura 12 demonstra o percentual de interação neutrófilo/estímulos nos intervalos de tempo 1, 2 e 3 horas. Ao analisar o perfil de interação neutrófilo/zimosan A, foi observado maior percentual de células Ly-6G<sup>+</sup> AlexaFluor 647<sup>+</sup> no tempo de 3 horas ( $44,08 \pm 2,223$ ), quando comparado aos tempos 2 horas ( $33,42 \pm 1,421$ ,  $p=0,0023$ ) e 1 hora ( $32,62 \pm 2,176$ ,  $p=0,0042$ ). Na interação neutrófilos/*L. amazonensis*, foi observado maior percentual Ly-6G<sup>+</sup> AlexaFluor 647<sup>+</sup> nos tempos de 2 ( $34,68 \pm 2,185$ ,  $p=0,0002$ ) e 3 hora ( $37,80 \pm 2,579$ ,  $p<0,0001$ ), ao compará-los ao tempo de 1 hora ( $18,92 \pm 1,559$ ). Na interação neutrófilo/*L. braziliensis*, observou-se maior interação nos tempos de 2 horas ( $42,93 \pm 2,917$ ,  $p=0,0418$ ) e 3 horas ( $61,20 \pm 7,063$ ,  $p=0,0087$ ), ao compará-los ao tempo de 1 hora ( $30,40 \pm 3,883$ ). Além disso, é importante ressaltar que a interação no tempo 3 horas foi superior ao tempo de 2 horas ( $p=0,0063$ ).

Ao comparar o percentual de células Ly-6G<sup>+</sup> AlexaFluor 647<sup>+</sup> em um mesmo tempo entre os diferentes estímulos (Zy, La ou Lb) pode-se observar que no tempo de 1 hora a interação entre Neutrófilo/zimosan A ( $p= 0,0005$ ) e neutrófilo/*L. braziliensis* ( $p= 0,0134$ ) são maiores que a interação entre *L. amazonensis*. Além disso, foi observado também que, a interação neutrófilo/*L. braziliensis* nos tempos 2 horas ( $p=0,0114$ ) e 3 horas ( $p= 0,0015$ ) foi maior quando comparado à interação com zimosan A; e, que no tempo de e 3 horas, a interação neutrófilo/ *L. braziliensis* é maior que a interação dessa célula com *L. amazonensis* ( $p= 0,0006$ ).



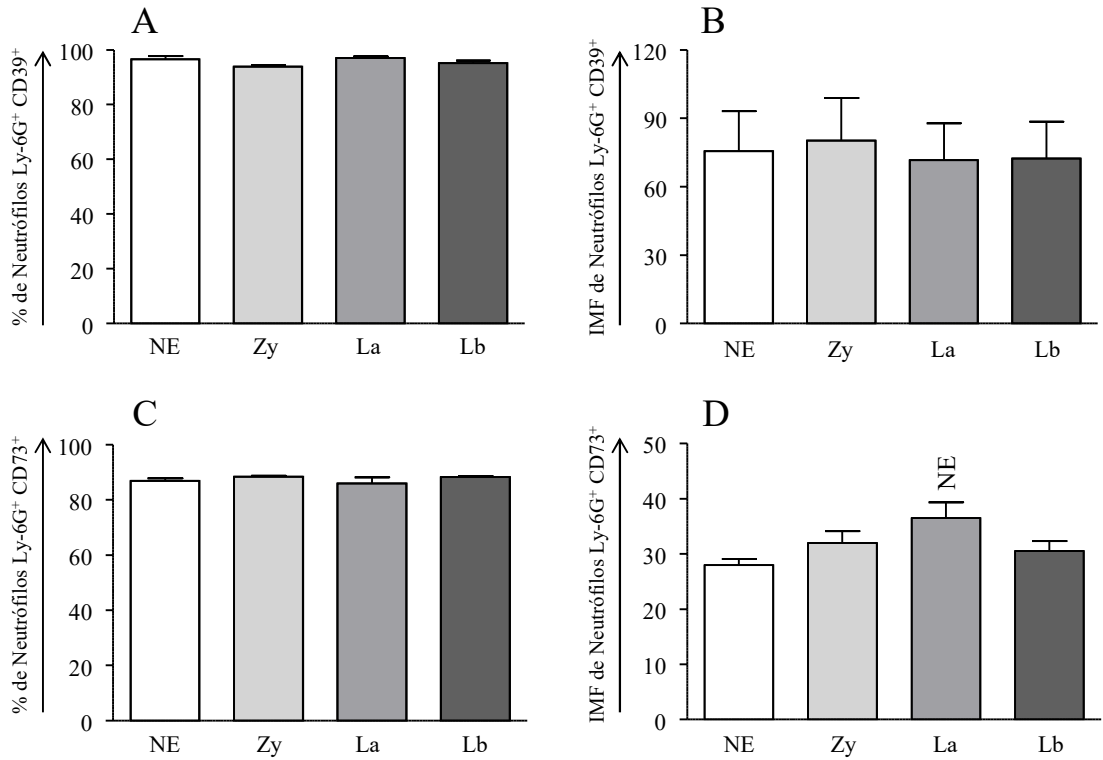
**Figura 12.** Interação entre neutrófilos e promastigotas de *Leishmania amazonensis* (La), *Leishmania braziliensis* (Lb) ou zimosan A (Zy), em diferentes tempos de cultivo (1h, 2h e 3h). Os resultados estão apresentados em gráficos de barra com valores de média e desvio padrão, como percentual de neutrófilos (Neu) Ly-6G<sup>+</sup> de acordo com cada condição de cultivo (Zy, La ou Lb) marcada com Alexa Fluor 647. As linhas conectoras representam as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tempos do mesmo estímulo (Zy, La ou Lb). As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) da análise comparativa entre as diferentes condições de cultivo, quando presentes, estarão indicadas pelos símbolos Zy, La e Lb, relacionadas às condições zimosan A, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente.

### 5.3 - Avaliação da expressão das ecto-nucleotidases (CD39 e CD73) em neutrófilos na presença de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* ou zimosan A

Considerando o papel das enzimas CD39 (converte o ATP em AMP gerando ADP) e CD73 (atua após a ação da CD39, convertendo o AMP em adenosina), foi avaliado se diferentes espécies de *Leishmania* seriam capazes de alterar o perfil de expressão destas enzimas em neutrófilos. Neste sentido, foram propostas duas abordagens diferentes (análise do percentual e da intensidade média de fluorescência de cada um dos marcadores avaliados). Inicialmente, foi realizada a avaliação do percentual de neutrófilos Ly-6G<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> (Figura 13A) e Ly-6G<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> (Figura 13C), não sendo observada qualquer diferença estatística entre os diferentes estímulos avaliados (Zy, La ou Lb).



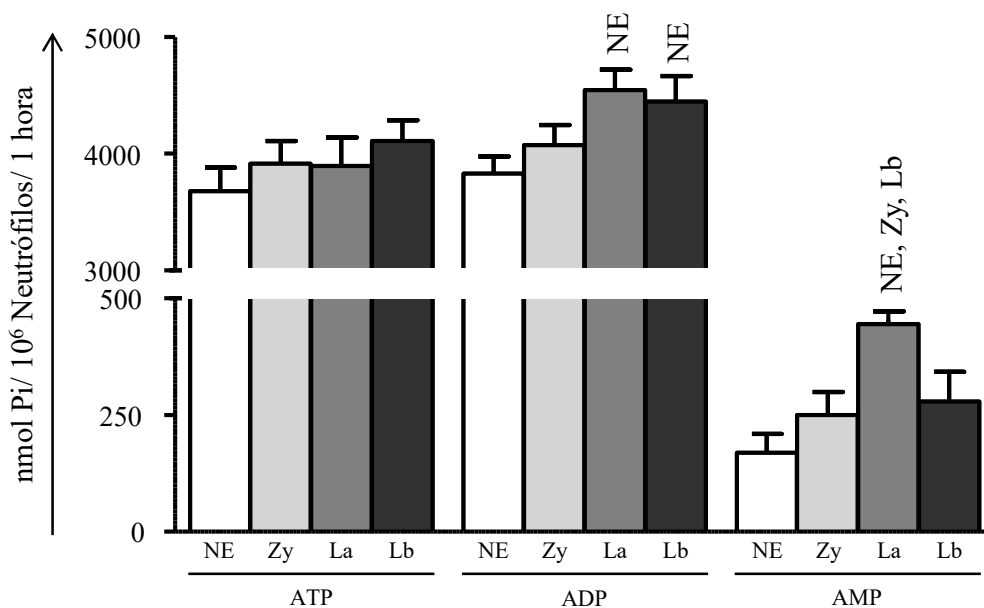
A segunda abordagem, relacionada a análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de neutrófilos Ly-6G<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> (Figura 13B) e Ly-6G<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> (Figura 13D), revelou diferença estatística apenas para a expressão de CD73<sup>+</sup>, sendo maior nos neutrófilos estimulados com *L. amazonensis* (36,52 ± 2,7), quando comparado à cultura não estimulada (27,94 ± 1,12, p= 0,0067) (Figura 13D).



**Figura 13. Expressão das ecto-nucleotidases CD39 e CD73 por neutrófilos, não estimulados (NE), ou na presença de promastigotas de *L. amazonensis* (La), *L. braziliensis* (Lb) ou zimosan A (Zy).** Os resultados estão apresentados em gráficos de barra com valores de média e desvio padrão, representando o percentual de neutrófilos Ly-6G<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> (A), intensidade média de fluorescência (IMF) de neutrófilos Ly-6G<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> (B), percentual de neutrófilos Ly-6G<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> (C) e intensidade média de fluorescência (IMF) de neutrófilos Ly-6G<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> (D).

#### 5.4 – Avaliação da atividade das enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) (CD39); e 5' nucleotidase (CD73) de neutrófilos na presença de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou zimosan A

Na avaliação por uma hora da atividade das enzimas E-NTPDase e Ecto-5'-nucleotidase na degradação do ATP, ADP e AMP, foi observado maior detecção de Pi na degradação do ADP por neutrófilos estimulados com *L. amazonensis* ( $4545 \pm 177,6$ ) e *L. braziliensis* ( $4446 \pm 220,2$ ), quando comparados ao grupo não estimulado ( $3831 \pm 146,8$ ,  $p=0,0167$ ; e  $p= 0,0488$ , La e Lb, respectivamente). Já na degradação do AMP foi detectado maior índice de Pi em neutrófilos estimulados com *L. amazonensis* ( $383,1 \pm 61,86$ ), quando comparado aos grupos não estimulado ( $169,7 \pm 39,86$ ,  $p=0,0005$ ), bem como quando estimulado com zimosan A ( $292,5 \pm 32,51$ ,  $p=0,0041$ ) e *L. braziliensis* ( $278,9 \pm 63,52$ ,  $p=0,0417$ ) (Figura 14).



**Figura 14.** Determinação da atividade das enzimas ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) (CD39) e 5' nucleotidase (CD73) na degradação do ATP, ADP e AMP por neutrófilos, não estimulados (NE), ou na presença de promastigotas de *L. amazonensis* (La), *L. braziliensis* (Lb) ou zimosan A (Zy). Os resultados estão apresentados em gráficos de barra com valores de média e desvio padrão, em mmol de Pi em  $10^6$  neutrófilos, considerando uma hora de análise, ao se avaliar diferentes substratos (ATP, ADP e AMP). Os símbolos NE, Zy e Lb, acima das barras do gráfico, indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) em relação as condições de cultivo não estimulada, zimosan A e *L. braziliensis*, respectivamente, para cada um dos substratos avaliados (ATP, ADP ou AMP).

## 5.5 - Avaliação dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em neutrófilos na presença de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou zimosan A

Para verificar uma possível participação dos receptores purinérgicos na produção de ROS, foram utilizados o MRS1754 (antagonista dos receptores A<sub>2B</sub>), o  $\alpha\beta$ -metileno (inibidor de CD73), o NECA (agonista de A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>) e a Suramina (antagonista dos receptores P2X e P2Y). Com tal propósito, a detecção da expressão intracelular de ROS por neutrófilos submetidos a diferentes condições foi realizada através da sonda carboxy-H2DCFDA.

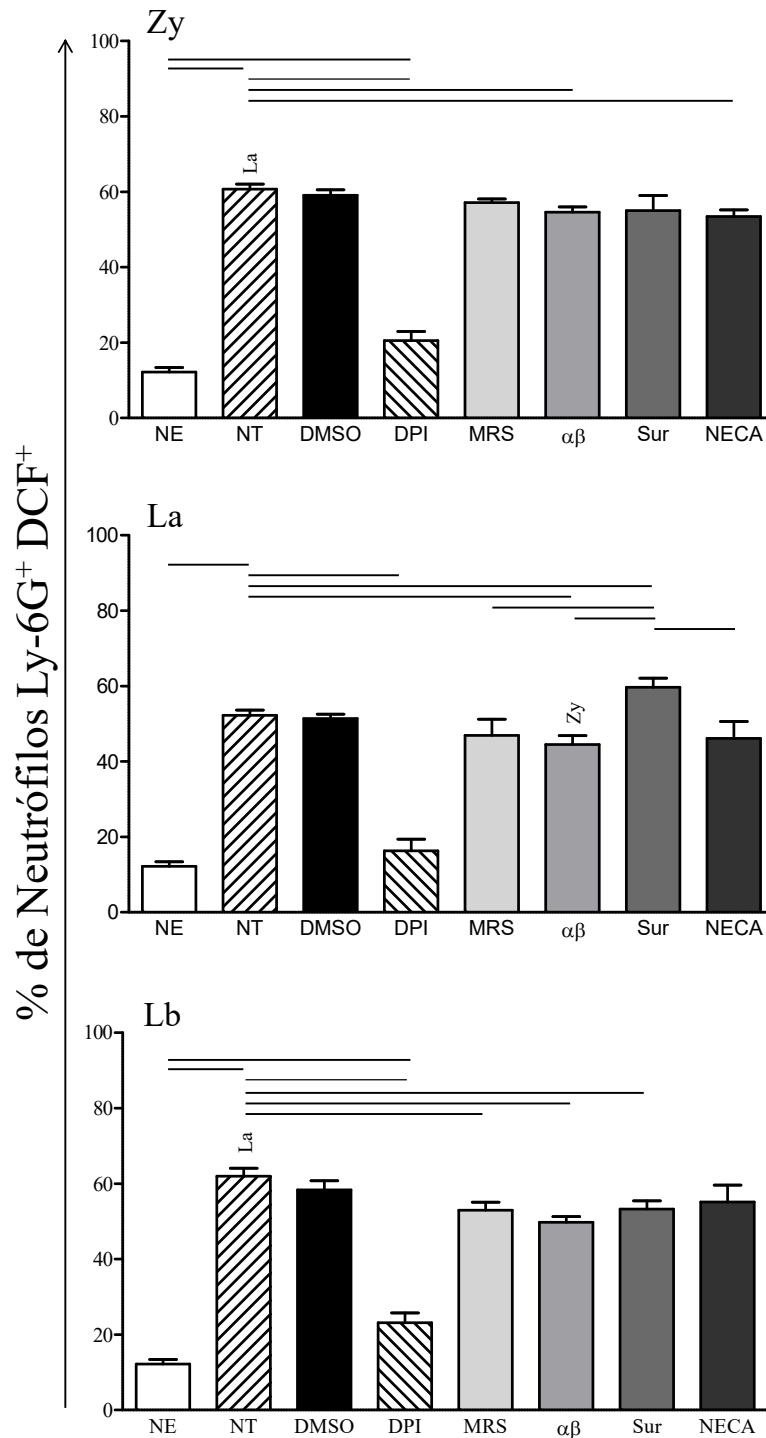
A Figura 15 mostra que a indução da síntese de ROS por neutrófilos não tratados e estimulados com zimosan A (Zy NT -  $60,73 \pm 1,28$ ,  $p < 0,0001$ ), *L. amazonensis* (La NT -  $52,26 \pm 1,35$ ,  $p < 0,0001$ ) e *L. braziliensis* (Lb NT -  $62,00 \pm 2,09$ ,  $p < 0,0001$ ) quando comparados aos neutrófilos do grupo não estimulado (NE -  $12,21 \pm 1,21$ ). Ao comparar a indução de ROS entre os estímulos, foi possível observar que tanto zimosan (Zy NT  $p=0,0003$ ) e *L. braziliensis* (Lb NT -  $p=0,0013$ ) apresentaram maior indução nos níveis de ROS, quando comparados ao grupo La NT. Foi observado que o tratamento com DPI foi capaz de reduzir ( $p < 0,0001$ ) a produção de ROS em neutrófilos na presença dos estímulos zimosan A ( $20,56 \pm 2,38$ ), *L. amazonensis* ( $16,27 \pm 3,10$ ) e *L. braziliensis* ( $23,14 \pm 2,59$ ), quando comparados aos respectivos grupos não tratados (Zy NT -  $60,73 \pm 1,28$ ; La NT -  $52,26 \pm 1,35$ ; Lb NT -  $62,00 \pm 2,09$ ). Nesse mesmo tratamento (DPI), houve maior ( $p < 0,0001$ ) produção de ROS nos grupos Zy ( $20,56 \pm 2,38$ ) e Lb ( $23,14 \pm 2,59$ ) em relação a cultura não estimulada ( $12,21 \pm 1,21$ ).

Ao avaliar o efeito dos tratamentos MRS 1754,  $\alpha\beta$ -metileno, Suramina e NECA na produção de ROS por neutrófilos estimulados com zimosan A, foi observado que apenas o NECA ( $52,40 \pm 1,86$ ) foi capaz de reduzir o nível de síntese de ROS, quando comparado ao grupo não tratado (NT -  $60,73 \pm 1,28$ ,  $p=0,0020$ ) (Figura 15Zy).

Nas culturas estimuladas com *L. amazonensis* (Figura 17-La), foi observada redução na síntese de ROS pelo grupo tratado com  $\alpha\beta$ -metileno ( $44,48 \pm 2,37$ ,  $p=0,0117$ ) e aumento pelo grupo tratado com Suramina ( $59,66 \pm 2,42$ ,  $p=0,0169$ ), quando comparados ao grupo estimulado não tratado ( $52,26 \pm 1,35$ ). Além disso, os resultados mostraram diferença nos níveis de produção de ROS entre os tratamentos no qual o grupo tratado com Suramina ( $59,66 \pm 2,42$ ) apresentou maior produção de ROS quando comparado aos demais tratamentos (MRS 1754 -  $46,91 \pm 4,27$ ,  $p=0,0251$ ,  $\alpha\beta$ -metileno -  $44,48 \pm 2,37$ ,  $p=0,0004$  e NECA -  $46,14 \pm 4,43$ ,  $p=0,0124$ ) (Figura 15La).

Na Figura 15Lb, que demonstra a síntese de ROS em neutrófilos estimulados com *L. braziliensis*, pode-se observar redução na síntese de ROS pelos grupos tratados com MRS 1754 ( $52,96 \pm 2,15$ ,  $p= 0,0100$ ),  $\alpha\beta$ -metileno ( $49,76 \pm 1,49$ ,  $p= 0,0002$ ) e Suramina ( $53,27 \pm 2,18$ ,  $p= 0,0108$ ), quando comparados ao grupo não tratado ( $62,00 \pm 2,09$ ).

Ao comparar os níveis de ROS induzidos por um mesmo tratamento na presença dos diferentes estímulos (zimosan A, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*), foi observado que, no grupo estimulado com *L. amazonensis* e tratado com  $\alpha\beta$ -metileno houve menor síntese quando comparado ao grupo estimulado com zimosan A ( $p=0,0112$ ) (Figura 15).



**Figura 15. Produção de ROS por neutrófilos, não estimulados (NE), ou na presença de promastigotas de *L. amazonensis* (La), *L. braziliensis* (Lb) ou zimosan A (Zy).** Os resultados estão apresentados em gráficos de barra com valores de média e desvio padrão, indicando o percentual de neutrófilos Ly-6G<sup>+</sup>DCF<sup>+</sup>. Diferentes condições de cultivo foram avaliadas, entre as quais: neutrófilos não estimulados com Zy, La ou Lb (NE; □); ou neutrófilos estimulados com Zy, La e Lb, na ausência de tratamento [neutrófilos não tratados (NT; ▨)] ou tratados com: DMSO (DMSO; ■); *Diphenyleiodonium chloride* (DPI; ▩) MRS 1754 (MRS, □); αβ-metileno (αβ; ▤); suramina (Sur; ▥) ou NECA (NECA, ▦). As barras conectoras representam diferenças estatísticas (p<0,05) entre as diferentes condições de cultivo em na presença de um mesmo estímulo. Os símbolos Zy e La, acima das barras do gráfico, indicam diferenças estatísticas (p<0,05) em relação as condições de cultivo estimulada com zimosan A ou com *L. amazonensis*, respectivamente, para uma mesma condição de tratamento.

## 5.6 - Avaliação dos níveis de Oxido Nítrico (NO) em neutrófilos na presença de promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou zimosan A

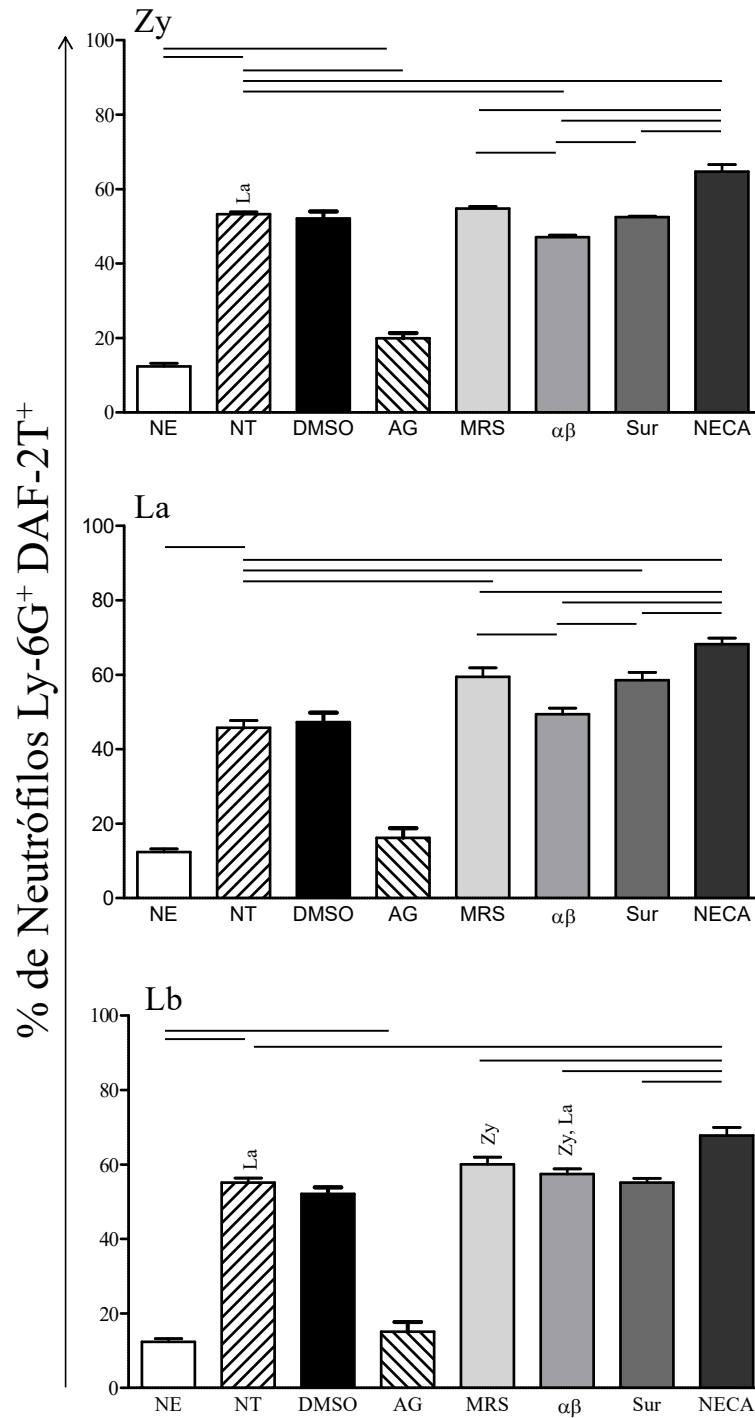
A capacidade de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou zimosan A, em induzir a síntese de NO está representado na Figura 16. Os resultados mostraram aumento na síntese de NO para os estímulos com zimosan A (Zy NT -  $53,28 \pm 0,579$ ,  $p < 0,0001$ ), *L. amazonensis* (La NT -  $45,77 \pm 1,92$ ,  $p < 0,0001$ ) e *L. braziliensis* (Lb NT -  $55,12 \pm 1,22$ ,  $p < 0,0001$ ), quando comparados ao grupo não estimulado (NE -  $12,40 \pm 0,816$ ). O tratamento com AG induziu diminuição ( $p < 0,0001$ ) da síntese de NO nos grupos zimosan A ( $19,93 \pm 1,41$ ), *L. amazonensis* ( $16,20 \pm 2,60$ ) e *L. braziliensis* (Lb AG -  $15,08 \pm 2,60$ ), quando comparados aos respectivos grupos não tratados das culturas estimuladas com Zy, La ou Lb. Ao comparar a indução de NO entre os estímulos, foi possível observar que tanto zimosan A (Zy NT  $p=0,0038$ ) como *L. braziliensis* (Lb NT -  $p= 0,0021$ ) apresentaram maior indução nos níveis de NO, quando comparados ao grupo La NT.

Avaliando os grupos estimulados com zimosan A (Figura 16Zy), foi observado redução na síntese de NO no grupo tratado com  $\alpha\beta$ -metileno ( $47,12 \pm 0,5064$ ,  $p < 0,0001$ ) e aumento em sua síntese pelo grupo tratado com NECA ( $64,70 \pm 1,863$ ,  $p=0,0002$ ), quando comparados ao grupo não tratado ( $53,28 \pm 0,5793$ ). Os resultados dos tratamentos mostraram que NECA ( $64,70 \pm 1,863$ ) induziu maiores níveis de NO quando comparado aos tratamentos com MRS 1754 ( $54,80 \pm 0,5040$ ,  $p=0,0011$ ),  $\alpha\beta$ -metileno ( $47,12 \pm 0,5064$ ,  $p < 0,0001$ ) e Suramina ( $52,46 \pm 0,2462$ ,  $p=0,0002$ ). Além disso, foi observado que  $\alpha\beta$ -metileno induz menor produção de NO comparado aos tratamentos com MRS 1754 ( $p < 0,0001$ ) e Suramina ( $p < 0,0001$ ).

Na Figura 16La, observou-se que os grupos estimulados com *L. amazonensis* e tratados com MRS 1574 ( $59,47 \pm 2,410$ ,  $p= 0,0012$ ), Suramina ( $58,55 \pm 2,113$ ,  $p=0,00012$ ) e NECA ( $68,22 \pm 1,639$ ,  $p < 0,0001$ ) induzem aumento na síntese de NO pelos neutrófilos estimulados e não tratados ( $45,77 \pm 1,922$ ). Ao comparar os tratamentos entre si, pode-se observar comportamento semelhante ao encontrado nos grupos estimulados com Zimosan, onde o NECA induziu maiores níveis na síntese de NO, quando comparado aos grupos tratados com MRS 1574 ( $p= 0,0184$ ),  $\alpha\beta$ -metileno ( $p < 0,0001$ ) e Suramina ( $p=0,0067$ ). O grupo tratado com  $\alpha\beta$ -metileno produziu menores níveis de NO em relação aos grupos tratados com MRS 1574 ( $p= 0,0062$ ) e Suramina ( $p=0,0065$ ).

Na Figura 16Lb, nos grupos estimulados com *L. braziliensis*, apenas o NECA ( $67,76 \pm 2,233$ ) induziu aumento de NO quando comparado ao grupo não tratado ( $55,12 \pm 1,222$ ,  $p=0,0006$ ). Em relação aos grupos estimulados e tratados, NECA foi capaz de induzir maiores níveis de NO, comparado aos tratamentos com MRS 1574 ( $60,02 \pm 1,956$ ,  $p=0,0279$ ),  $\alpha\beta$ -metileno ( $57,46 \pm 1,360$ ,  $p=0,0053$ ) e Suramina ( $55,14 \pm 1,178$ ,  $p=0,0011$ ).

Ao comparar os níveis de NO induzidos por um mesmo tratamento na presença dos diferentes estímulos (zimosan A, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*) foi observado que, o grupo estimulado com *L. braziliensis* e tratados com MRS 1574 apresentou maiores níveis de NO, quando comparado ao grupo estimulado com zimosan A ( $p=0,0488$ ). Além disso, pode-se observar também, que as culturas estimuladas com *L. braziliensis* e tratadas com  $\alpha\beta$ -metileno apresentaram maiores níveis na síntese de NO, quando comparado aos grupos estimulados com zimosan A ( $p=0,0004$ ) e *L. amazonensis* ( $p=0,0050$ ) (Figura 16).

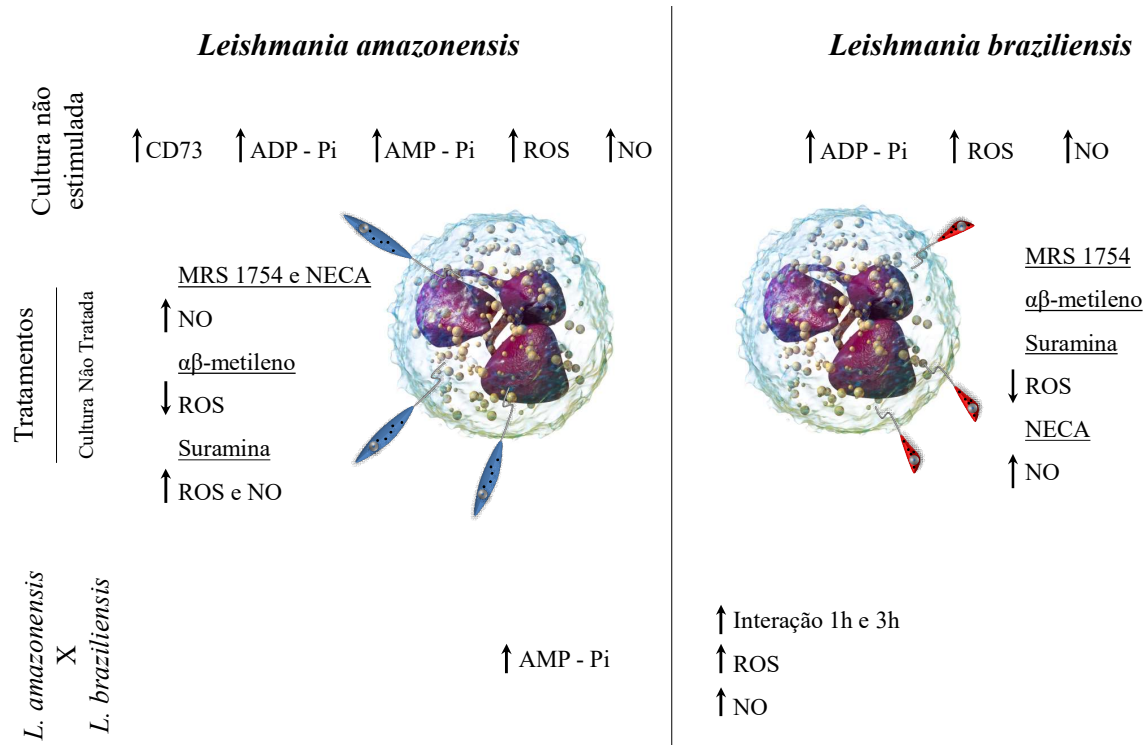


**Figura 16. Produção de NO por neutrófilos, não estimulados (NE), ou na presença de promastigotas de *L. amazonensis* (La), *L. braziliensis* (Lb) ou zimosan A (Zy).** Os resultados estão apresentados em gráficos de barra com valores de média e desvio padrão, indicando o percentual de neutrófilos Ly-6G<sup>+</sup>DCF<sup>+</sup>. Diferentes condições de cultivo foram avaliadas, entre as quais: neutrófilos não estimulados com Zy, La ou Lb (NE; □); ou neutrófilos estimulados com Zy, La e Lb, na ausência de tratamento [neutrófilos não tratados (NT; ▨)] ou tratados com: DMSO (DMSO; ■); Aminoguanidina (AG; ▩) MRS 1754 (MRS, □); αβ-metileno (αβ; ▤); suramina (Sur; ▥) ou NECA (NECA, ▦). As barras conectoras representam diferenças estatísticas (p<0,05) entre as diferentes condições de cultivo em na presença de um mesmo estímulo. Os símbolos Zy e La, acima das barras do gráfico, indicam diferenças estatísticas (p<0,05) em relação às condições de cultivo estimulada com zimosan A ou com *L. amazonensis*, respectivamente, para uma mesma condição de tratamento.



## 5.7 - Síntese dos resultados

A Figura 20 representa, de forma esquemática, a síntese dos principais resultados obtidos nesta dissertação, destacando para aquelas encontradas em neutrófilos cultivado na presença de *Leishmania amazonensis* (painel esquerdo) ou *Leishmania braziliensis* (painel direito).



**Figura 17. Síntese dos resultados obtidos pela interação *in vitro* entre neutrófilos e *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*.** Na região superior da figura estão as diferenças observadas pelos neutrófilos estimulados por *L. amazonensis* (painel esquerdo) ou *L. braziliensis* (painel direito) em relação aos neutrófilos não estimulados. Na região intermediária, encontram-se ilustradas as diferenças decorridas, na síntese de ROS e NO, pelos neutrófilos estimulados com *L. amazonensis* (painel esquerdo) ou *L. braziliensis* (painel direito) e tratados com MRS 1754, αβ-metileno, suramina e NECA, em relação à cultura não tratada e estimulada. Na região inferior, estão representadas as diferenças observadas entre as espécies de *Leishmania* avaliadas neste trabalho.

## 6 - DISCUSSÃO

Os efeitos da infecção por parasitos do gênero *Leishmania* na sobrevivência e no perfil de ativação fenotípico/funcional de neutrófilos são dependentes de fatores como a espécie do parasito, de seu estágio de desenvolvimento, bem como, do modelo utilizado para o estudo (ensaios *in vitro*, *in vivo*, espécie e linhagem do modelo experimental que pode ser susceptível ou resistente à infecção), como revisado por Ribeiro-Gomes & Sacks, (2012).

Os neutrófilos são células de vida curta que podem prejudicar a eliminação do parasito, uma vez que podem ser fagocitados por macrófagos, sem ativar os mecanismos leishmanicidas, favorecendo assim a sobrevivência do parasito no hospedeiro (Laskay *et al.*, 2003; Afonso *et al.*, 2008; John & Hunter, 2008; Peters *et al.*, 2008; Novais *et al.*, 2009). Ribeiro-Gomes *et al.* (2004) mostraram que a interação *in vitro* entre macrófagos infectados e neutrófilos apoptóticos pode alterar o desfecho da infecção por *L. major*, uma vez que em animais suscetíveis, ocorre um aumento da carga parasitária, enquanto em animais resistentes, ocorre um aumento da produção de TNF- $\alpha$ , resultando na morte do parasito. Além disso, estes autores mostraram que a depleção de neutrófilos *in vivo* leva ao aumento na carga parasitária em camundongos C57BL/6 (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Ribeiro-Gomes *et al.* (2012) mostraram, *in vivo*, que células dendríticas reduzem a expressão de marcadores de ativação e a capacidade de apresentação do antígeno após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos/infectados por *Leishmania major*. Cabe ressaltar que os nossos resultados mostraram que não houve alteração na viabilidade de neutrófilos após 3 horas de cultura, independente do estímulo utilizado, bem como nos tratamentos empregados para avaliação do papel dos receptores purinérgicos na resposta imune (Figura 11). Deste modo, fica evidente que as alterações em diferentes biomarcadores avaliados neste estudo não são decorrentes da perda de viabilidade dos neutrófilos, mas do tipo de estímulo (zimosan A, *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*) ou tratamento (MRS,  $\alpha\beta$ -metileno, suramina, AG, NECA, DPI).

Neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o local da infecção (Beil *et al.*, 1992; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2008), sendo capaz de fagocitar e destruir o parasito (Awasthi *et al.*, 2004). No presente trabalho foi possível demonstrar a capacidade de interação entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis* com os neutrófilos, por até três horas de cultivo celular (Figura 12). Além disso, diferentes estudos empregando parasitos marcados (*L. major* ou *L. donovani*), por citometria de fluxo, mostraram que neutrófilos são as células predominantemente infectadas após as primeiras horas de infecção, na derme da orelha de camundongos (Peters *et al.*, 2008; Thalhoffer *et al.*, 2011; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012).

O presente estudo demonstrou que neutrófilos interagem com diferentes espécies de *Leishmania* de maneira distinta, de modo que foi observado que neutrófilos interagem mais com *L. braziliensis* quando comparado a *L. amazonensis*, nos tempos de 1h e 3h de cultivo. Já na interação de neutrófilos com *L. amazonensis*, foi observado semelhança entre os tempos de 2 e 3 horas, ao passo que esses dois tempos demonstram interação maior ao tempo de 1 hora. Os resultados obtidos estão em consenso aos encontrados por Batista *et al.* (2013), que além de observar esse mesmo perfil para *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em cultivos *in vitro* de 3 horas, demonstraram também que a interação de neutrófilos com *L. major* é menor comparado às duas espécies citadas. Em estudo de Figueiredo (dados não publicados) utilizando células dendríticas de C57BL/6, foi observado comportamento oposto ao do presente estudo, no qual a interação entre *L. amazonensis* e as células dendríticas é superior ao observado para a interação dessas mesmas células em relação à *L. braziliensis*. Silva-Junior *et al.* (2014), mostraram que macrófagos humanos possuem um perfil de infecção também distinto do observado no presente estudo, sendo essas células mais infectadas por *L. amazonensis* do que por *L. braziliensis*. Dados recentemente obtidos pelo nosso grupo (Faria *et al.*, dados não publicados) mostraram que neutrófilos humanos possuem perfil de interação com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* semelhante ao encontrado no presente estudo. Em um estudo com células dendríticas, Colmenares *et al.* (2004) mostraram que o CD209 presente em células dendríticas seria o responsável por reconhecer as formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* ou *L. pifanoi*, mas o CD209 não interagiu com formas promastigotas metacíclicas de *L. major*. Além disso, a ligação entre *Leishmania* e a célula dendrítica, via receptor CD209, mostrou ser independente de LPG. Vale ressaltar que esse trabalho mostrou que o receptor presente em células dendríticas apresenta afinidade variável entre diferentes espécies de parasito, o que reflete diretamente no estabelecimento e direcionamento da resposta imune. Considerando o exposto, pode-se sugerir que também exista em neutrófilos algum receptor semelhante ao descrito por Colmenares *et al.* (2004), que poderia explicar a distinta capacidade fagocítica de neutrófilos frente à infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. Além disso, outros fatores como características particulares das espécies de *Leishmania*, além do modelo experimental empregado nesse trabalho poderiam influenciar nessa distinta capacidade fagocítica.

Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares são capazes de afetar a ativação e a migração celular. Neste sentido, diferentes trabalhos mostraram que o ATP extracelular induz a maturação de células dendríticas e a ativação de linfócitos TCD4<sup>+</sup> do tipo 1, enquanto a adenosina inibe a ativação de células dendríticas e a produção de citocinas pró-inflamatórias

por estas células (La Sala *et al.*, 2001; Panther *et al.*, 2003; Hofer *et al.*). O ATP extracelular é acumulado em situações de injúria celular ou infecção, e é considerado um “sinal de perigo” (La Sala *et al.*, 2003). A liberação de ATP pode ser mediada por receptores P2X7, que não somente sinalizam concentrações extracelulares dessa molécula, mas também estão envolvidos com a sua secreção (Pellegatti *et al.*, 2005). Interessantemente, estudo de Chaves *et al.*, (2009) mostraram que *L. amazonensis* aumenta a expressão do receptor P2X7 em macrófagos murinos. Ledderose *et al.* (2015) demonstraram que a liberação do ATP pelos neutrófilos é dependente da sua produção pelas mitocôndrias, sendo que a localização dessas organelas se dá próximo ao local de liberação do ATP.

Na superfície de células de mamíferos há enzimas que regulam as concentrações extracelulares de ATP e adenosina. Essas enzimas são denominadas ENTPDase (CD39) e são responsáveis pela hidrólise do ATP e ADP em AMP, e a 5'-nucleotidase (CD73), que converte o AMP em adenosina (Berchtold *et al.*, 1999; Bours *et al.*, 2006). Estudo de Mahamed *et al.* (2015), utilizando animais C75BL/6 CD73<sup>-/-</sup> infectados por *Toxoplasma gondii*, fizeram observações relevantes sobre o papel e importância da 5'-nucleotidase para o animal perante a infecção. Estes autores relataram queda na sobrevivência e perda de peso dos animais CD73<sup>-/-</sup>, bem como aumento de mediadores inflamatórios como NO, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , demonstrando a importância de elevadas concentrações de adenosina extracelular para um perfil de resposta imune menos pró-inflamatória. Curiosamente, os dados obtidos no presente estudo, demonstraram que o percentual de neutrófilos que expressam tanto a CD39, bem como a CD73, é independente da condição de cultivo realizada (Figuras 13A e 13C). De forma interessante, Figueiredo *et al.* (2012), demonstraram que células dendríticas infectadas com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* não variam a expressão dessa enzimas em sua superfície. Entretanto, estes autores relataram que o aumento da expressão de CD39 e CD73 por células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Figueiredo *et al.*, 2012). Reutershan *et al.* (2009) demonstraram a importância das enzimas CD39 e CD73 no recrutamento de neutrófilos para os pulmões em animais estimulados com LPS, indicando que a ausência dessas enzimas resultaria em aumento de infiltrado por neutrófilos no interstício pulmonar e espaço broncoalveolar.

Nos resultados obtidos no presente estudo, o percentual de expressão das enzimas é invariável perante as condições de cultivo. Dessa forma, uma abordagem de análise, através da Intensidade Média de Fluorescência (IMF), foi realizada permitindo avaliar a quantidade média dessas enzimas por neutrófilo. Essa abordagem demonstrou que não há alteração na quantidade de CD39 em neutrófilos considerando as diferentes condições de cultivo. Por

outro lado, esta abordagem demonstrou maior expressão de CD73 em neutrófilos estimulados por *L. amazonensis*, em relação aos neutrófilos não estimulados (Figura 13D).

O próximo passo realizado foi avaliar a participação dessas mesmas enzimas na degradação do ATP, ADP e AMP, através da detecção de Pi (Fosforo inorgânico) (Figura 14). Mesmo não havendo diferença na expressão da CD39, a degradação do ADP gerou maior liberação de Pi pelos neutrófilos estimulados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, em relação a cultura não estimulada. Curiosamente não houve diferença na degradação do ATP (independente do estímulo utilizado), que seria realizado pela enzima CD39. Este fato poderia ser justificado por uma possível presença de receptores de ATP, em quantidade superior aos de ADP, de forma que a quantidade de ATP disponível para a CD39 seria reduzida. Por outro lado, a degradação do AMP foi superior pelos neutrófilos estimulados com *L. amazonensis* em relação às demais condições de cultivo (cultura não estimulada, zimosan A ou *L. braziliensis*; Figura 14). Este resultado poderia estar relacionado ao aumento da expressão da enzima CD73 (Figura 13D) que é induzido pelo cultivo de neutrófilos com *L. amazonensis* (Figura 14), resultando em maior atividade enzimática, ao se utilizar o substrato AMP (Figura 15), nesta condição de cultivo. Figueiredo *et al.* (2012) observaram que células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são capazes de aumentar a degradação de ATP e ADP, porem são incapazes de alterar a degradação do AMP.

Neutrófilos são classicamente conhecidos pela liberação dos produtos da explosão respiratória induzido pela fagocitose (Chang, 1981; Pearson & Steigbigel, 1981). A produção de ROS e NO está diretamente ligada à capacidade fagocítica de neutrófilos, bem como, a sua capacidade em eliminar patógenos (Horta *et al.*, 2011; Charmoy *et al.*, 2007). Com o objetivo de avaliar a resposta imune funcional de neutrófilos, foi realizada a análise da expressão intracelular de ROS e NO por neutrófilos infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, após 3 horas de cultivo. Os resultados obtidos demonstram que tanto *L. amazonensis* como *L. braziliensis* são capazes de induzir neutrófilos a produzirem ROS e NO (Figuras 15 e 16, respectivamente). É importante ressaltar que a interação dos neutrófilos com *L. braziliensis* foi capaz de produzir níveis mais altos tanto de ROS quanto de NO, em comparação ao estímulo por *L. amazonensis*. Apesar dos poucos estudos disponíveis mostrando a produção de ROS e NO por neutrófilos infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, vale destacar que estudo de Charmoy *et al.* (2007) mostraram que a produção de NO por neutrófilos de camundongos C57BL/6 cultivados na presença de formas metacíclicas de *L. major* estava relacionado a um perfil de proteção a infecção. Além disso, Rousseau *et al.* (2001) e McFarlane *et al.* (2008) mostraram que neutrófilos de camundongos BALB/c induzem a

morte do parasito e auxiliam no estabelecimento de uma resposta protetora na infecção por *L. donovani* ou *L. infantum* através da produção de ROS e NO. Desta forma, esses trabalhos mostraram que neutrófilos fagocitam mais *L. braziliensis* e são capazes de produzir mais ROS e NO, quando comparados à infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*. Neste sentido, os dados obtidos no presente estudo permitem especular que neutrófilos possuem papel importante no controle da infecção por *L. braziliensis*, dependente de NO e ROS.

A fim de determinar a possível participação dos receptores purinérgicos na resposta imune anti-*Leishmania*, mediante a detecção dos níveis de produção de ROS e NO, foram utilizados compostos químicos que atuam seletivamente nesses receptores (MRS 1754,  $\alpha\beta$ -metileno, suramina e NECA). No presente estudo, a adição do MRS 1754, antagonista dos receptores A<sub>2B</sub>, às culturas de neutrófilos com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, promoveu aumento da produção de NO e na presença de *L. braziliensis* (Figuras 15 e 16). Estudos de Kreckler *et al.* (2011) demonstraram que a adição do MRS 1754 em culturas de macrófagos, na presença de três diferentes estímulos (LPS, zimosan e A23187), não foi capaz de induzir modificações na síntese de TNF- $\alpha$ , citocina pró-inflamatória que atua na ativação da produção de NO. De maneira semelhante, Batista *et al.* (2013) não observaram diferença na indução de TNF- $\alpha$  por neutrófilos infectados por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Alves *et al.* (2014) observaram que monócitos de pacientes portadores de LT, após tratamento, produziram maiores níveis de TNF- $\alpha$  e NO, em relação aos mesmo pacientes antes do tratamento.

A adição do  $\alpha\beta$ -metileno, bloqueador da atividade de CD73, às culturas de neutrófilos estimulados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, apresentaram redução na produção de ROS, em ambas as culturas (Figuras 15 e 16). Estudo de Beavis *et al.* (2012) e de Regateiro *et al.* (2011) mostraram que a expressão de CD73 é *upregulated* por fatores pró-inflamatórios como IFNs, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Por sua vez, o bloqueio da enzima CD73 pelo  $\alpha\beta$ -metileno, pode levar a célula a um perfil de resposta imune pró-inflamatório, com síntese dos fatores anteriormente citados, devido ao aumento da concentração de AMP no ambiente extracelular. Nesse sentido, o bloqueio de CD73 e consequente aumento de AMP, pode levar a célula a expressar mais CD73 afim de promover a redução de AMP extracelular e evitar os possíveis danos ocasionados por uma resposta inflamatória, como os observados em lesões mucosas causadas por *L. braziliensis*. Neste sentido, o estímulo do aumento de expressão de CD73 poderia levar a degradação do AMP gerando elevados níveis de adenosina, por sua vez ativando os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>, gerando uma resposta anti-inflamatória.

Outro composto químico empregado no presente estudo foi a suramina, antagonista dos receptores P2X e P2Y. A atuação da suramina nesses receptores ocorre pelo bloqueio da

associação das subunidades alfa e beta gama da proteína G (Chung & Kermodé, 2013). A suramina possui importância médica, sendo utilizada na redução da proliferação de tumores, na redução de alguns fatores de crescimento incluindo *Fibroblast Growth Factor* (FGF), e *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF). Além disso, possui atividade antiprotozoários e antihelmíntica, com efeito na Tripanossomíase Humana Africana (Darsaud *et al.*, 2004) e Oncocercose (Anderson & Fuglsang, 1978), respectivamente. Esse fármaco está incluído na *World Health Organization's List of Essential Medicines* (WHO, 2013). Os resultados do presente estudo demonstraram que na presença de suramina, os neutrófilos estimulados por *L. amazonensis* aumentaram a produção tanto de ROS, quanto de NO, em relação às células estimuladas e não tratadas. No entanto, neutrófilos na presença de *L. braziliensis* e do tratamento com suramina, apresentaram diminuição na síntese de ROS quando comparado aos neutrófilos estimulados e não tratados (Figura 15). Cabe ressaltar que a presença de suramina nas culturas estimuladas com *L. amazonensis* foi capaz de elevar a síntese de ROS e NO para níveis semelhantes aos que foram observados no estímulo com *L. braziliensis*, em relação a cultura não tratada (Figuras 15 e 16). Estudos realizados por Pesanti (1978) e Sipka *et al.*, (1991) demonstraram que a adição de suramina em culturas de monócitos foi capaz de induzir a fagocitose de *Listeria monocytogenes* e *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, no estudo de D'Arcy *et al.*, (1975) foi observado que a presença de suramina inibiu a fagocitose de *Mycobacterium lepraemurium* por macrófagos. Tendo em vista os resultados encontrados por diferentes autores na fagocitose de diversos microorganismos na presença de suramina, o perfil de expressão de ROS e NO encontrados no presente estudo poderia ser explicado por uma possível alteração na capacidade de neutrófilos interagirem com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, uma vez que, como já citado, o perfil de produção de ROS e NO é comumente acompanhado pelo perfil na fagocitose. Cabe ressaltar também, que a suramina possui diferentes mecanismos de ação, não apenas como agente antagonista dos receptores P2X e P2Y. Um desses fatores poderia ser o responsável pelo aumento na síntese de ROS e NO encontrados nos neutrófilos estimulados com *L. amazonensis*, uma vez que a redução da ligação dos agonistas desses receptores, como o ATP ou AMP, induziria um perfil de resposta imune anti-inflamatório, como pode ser observado para os cultivos na presença de *L. braziliensis*. Outra hipótese que pode justificar a indução de um perfil mais pró-inflamatório pela *L. amazonensis* na presença da suramina, envolve as vias de sinalizações que podem ser ativadas e que possuem como resultado síntese de ROS e NO, uma vez que, não apenas os receptores purinérgicos estão envolvidos na ativação desses produtos. Talvez, a inativação dos receptores pela suramina reduza os níveis extracelulares de ROS e NO, e esse fato pode

induzir a célula a ativar ou superativar outras vias de sinalização, de modo compensatório, ao ponto de elevar de forma significativa a produção de ROS e NO. Dessa forma, independente do mecanismo envolvido, o aumento desses produtos será favorável à eliminação do parasito de forma mais rápida, porém, *in vivo*, poderia também levar a destruição tecidual.

O NECA que é um análogo à adenosina, que se liga de forma agonista aos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>. Neste estudo, o NECA foi utilizado em uma concentração que é capaz de induzir uma resposta pró-inflamatória nas células alvos. Neste sentido os resultados da Figura 16 mostram o aumento na síntese de NO pelos neutrófilos na presença das duas espécies de *Leishmania* avaliadas. No entanto, esse efeito não foi observado para ROS (Figura 15). van der Hoeven *et al.* (2008) mostraram que a produção do superóxido em neutrófilos de camundongos C57BL/6 tratados com NECA estava relacionada ao estímulo utilizado, que induzia uma expressão diferenciada dos receptores de adenosina. As diferenças observadas no presente estudo na produção de ROS e NO pelos neutrófilos estimulados com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, tratados com NECA, pode se dar pela capacidade dessas duas espécies modularem, de forma diferente, a expressão dos receptores envolvidos no reconhecimento do NECA.

Os resultados observados no presente estudo, em conjunto com os dados obtidos por Batista *et al.* (2013), mostraram que *L. amazonensis* é capaz de induzir os neutrófilos a um perfil de resposta imune menos inflamatório em relação aos neutrófilos estimulados por *L. braziliensis*, uma vez que os níveis de produção de ROS e NO são menores em neutrófilos estimulados por *L. amazonensis*. Estes resultados poderiam estar relacionados a uma maior capacidade da *L. amazonensis* em se manter no hospedeiro de forma mais “silenciosa”, visto que induz relacionados a mediadores efetores menos exuberante. Além disso, com estes resultados podemos especular que pacientes com leishmaniose tegumentar causada por *L. amazonensis* poderiam apresentar um perfil mais grave que as formas clínicas causadas por *L. braziliensis*. Este fato poderia estar relacionado ao aumento da expressão de CD73, induzindo maior degradação de AMP, de modo que a concentração extracelular de adenosina também estaria elevada, garantindo um microambiente menos pró-inflamatório, favorecendo a multiplicação do parasito. Nesse ponto cabe ressaltar que os efeitos promovidos pela adenosina é dose dependente, sendo que em baixas concentrações sua ação é via A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> que possuem maior afinidade pela adenosina em relação aos receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>, que por sua vez são ativados em altas concentrações de adenosina (Cronstein *et al.*, 1989; Barletta *et al.*, 2012). É importante mencionar ainda que o aumento intracelular da concentração de cAMP, promovido pela ativação desses receptores, tem grande importância na inibição da



resposta imune (Raskovalova et al., 2005). Logo, o aumento na concentração extracelular de adenosina leva à ativação dos receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub>, que possuem como resultado redução no tráfego de neutrófilos, bem como diminuição de suas atividades efetoras como a explosão oxidativa, produção de mediadores pró-inflamatórios e liberação de grânulos. Além dos efeitos citados, o acelerado metabolismo do AMP reduz sua concentração no meio extracelular, podendo levar a uma redução na ativação dos receptores P<sub>2Y</sub> e P<sub>2X</sub>, que por sua vez possuem um papel pró-inflamatório, podendo ser outro fator de modulação da resposta imune ocasionado por *L. amazonensis*. Outro ponto que pode embasar essa teoria é o aumento na síntese de NO pelos neutrófilos estimulados por esse parasito na presença do MRS 1754, podendo inferir que a adenosina liberada pela CD73 possua como alvo principal os receptores A<sub>2B</sub>, alvo de bloqueio do MRS 1754, impedindo-o de ser ativado pela adenosina e não gerando resposta imune anti-inflamatória. Cabe ressaltar que esse resultado causado pelo MRS 1754 seria desfavorável à sobrevivência do parasito. Outro ponto interessante é que a ativação dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> leva a aumento da quimiotaxia e da atividade fagocítica de neutrófilos (Cronstein et al., 1989; Barletta et al. 2012), o que pode justificar a diferença na interação dos neutrófilos estimulados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Com o acúmulo de adenosina extracelular, haveria menor ativação dos receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub>, uma vez que a ativação dos receptores de adenosina é dose dependente. Consequente haveria redução da fagocitose de *L. amazonensis*, como observado em relação à *L. braziliensis*, e consequentemente redução dos níveis de ROS e NO, que são diretamente relacionados a essa interação. Cabe ressaltar que espécies de *Leishmania* são capazes de degradar ATP, ADP e AMP, como foi demonstrado por Marques da Silva et al. (2008), sendo que *L. amazonensis* possui maior capacidade em degradar ATP, ADP e AMP comparada à *L. braziliensis*. Esses dados podem também sustentar a teoria pela qual *L. amazonensis* usaria o aumento da adenosina extracelular como rota de fuga dos efeitos leishmanicidas. Diante deste cenário, é possível especular que os dados apresentados neste trabalho, poderiam explicar, mesmo que parcialmente, o motivo pelo qual *L. braziliensis* poderia causar em humanos a forma clínica mucosa (altamente pró-inflamatória), enquanto que a *L. amazonensis* poderia induzir a forma clínica difusa da leishmaniose tegumentar (forma anérgica da infecção).

## 7 - CONCLUSÃO

Os dados coletados no presente estudo possibilitaram demonstrar diferenças na interação neutrófilo e *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, ao avaliar diferentes biomarcadores. Neste sentido, a maior interação de *L. braziliensis* com os neutrófilos, ao se comparar com *L. amazonensis*, pode ter favorecido uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Por outro lado, a presença de *L. amazonensis* em cultivo, induziu em neutrófilos o aumento da expressão de CD73, resultando em maior atividade enzimática, no que diz respeito a degradação do AMP. Assim, haveria um aumento de adenosina, que poderia contribuir para um microambiente menos pró-inflamatório durante a infecção por *L. amazonensis* em neutrófilos, ao se comparar pela infecção por *L. braziliensis*.

## 8 - REFERÊNCIAS

ABBRACCHIO MP, CERUTI S. (2007) P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic.Signal.* 3, 13-25.

AFONSO L, BORGES VM, CRUZ H, RIBEIRO-GOMES FL, DOSREIS GA, DUTRA AN, CLARÊNCIO J, DE OLIVEIRA CI, BARRAL A, BARRAL-NETTO M, BRODSKYN C.I. (2008) Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol.* 84, 389-396.

AFONSO LCC, SCOTT P. (1993) Immune response associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 61, 2952-2959.

AGA E, KATSCHINSKI DM, VAN ZANDBERGEN G, LAUFS H, HANSEN B, MÜLLER K, SOLBACH W, LASKAY T. (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.* 169, 898-905.

AHERNE CM, KEWLEY EM, ELTZSCHIG HK. (2011) The resurgence of A2B adenosine receptor signaling. *Biochim.Biophys.Acta* 1808, 1329-1339.

AL-SHAMI A, MAHANNA W, NACCACHE PH. (1998) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Selective activation of Jak2, Stat3, and Stat5b. *J. Biol. Chem.* 273:1058-1063.

ALVES MLR. Avaliação do perfil fenotípico-funcional de monócitos de pacientes portadores de leishmaniose cutânea localizada, tratados com o antimoníato de N-metil glucamina. *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação de Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais.* 2014.

AMEEN M. (2010) Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin and Exp Dermatol.*; 35: 699-705.

ANDERSON CF, MENDEZ S, SACKS D.L. (2005) Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 174, 2934-2941.

ANDERSON J, FUGLSANG H. (1978) Further studies on the treatment of ocular onchocerciasis with diethylcarbamazine and suramin. *Br J Ophthalmol.* 62(7):450-7.

AWASTHI A, MATHUR RK & SAHA B. (2004) Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J of Medical Research.* 119: 238-258.

BACHA HA, TUON FF, ZAMPIERI RA, FLOETER-WINTER LM, OLIVEIRA J, NICODEMO, AC, QUIROGA MM, MASCHERETTI M, BOULOS M, AMATO, VS. (2011) *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the state of Para, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*; 105: 173-178.

BAGGIOLINI M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 392, 565-568.

BARATTA-MASINI A, TEIXEIRA-CARVALHO A, MALAQUIAS LC, MAYRINK W, MARTINS-FILHO AO, CORRÊA-OLIVEIRA R. (2007) Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. *Front Biosci.*; 12: 839-849.

BARLETTA KE, CAGNINA RE, BURDICK MD, LINDEN J, MEHRAD B. (2012) Adenosine A<sub>2B</sub> receptor deficiency promotes host defenses against gram-negative bacterial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 15;186(10):1044-50.

BASTIEN P, BLAINEAU C, & PAGES M. (1992) *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitol. Today* 8, 174-177.

BATISTA MA. Avaliação, *in vitro*, da resposta imune de neutrófilos de camundongos C57BL/6 estimulados com diferentes espécies de *Leishmania*. *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação de Imunobiologia de Protozoários Universidade Federal de Ouro Preto.* 2013.

BEAVIS PA, STAGG J, DARCY PK, SMYTH MJ. (2012) CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol.* 33(5):231-7.

BECKER I, SALAIZA N, AGUIRRE M, DELGADO J, CARRILLO-CARRASCO N, KOBEH LG, RUIZ A, CERVANTES R, TORRES AP, CABRERA N, GONZALEZ A, MALDONADO C, ISIBASI A. (2003) *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through Toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130, 65–74.

BEIL WJ, MEINARDUS-HAGER G., NEUGEBAUER DC, SORG C. (1992) Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J. Leuk. Biol.* 52, 135-142.

BERCHTOLD S, OGILVIE AL, BOGDAN C, MUHL-ZURBES P, OGILVIE A, SCHULER G, STEINKASSERER A. (1999) Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases. *FEBS Lett.* 458, 424-428.

BERMAN JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev. Inf. Dis.* 1988; 10: 560-586.

BORREGAARD N, COWLAND J. B. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte *Blood* 89, 3503–3521.

BORREGAARD N, SØRENSEN OE, THEILGAARD-MÖNCH K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 28, 340–345 (2007).

BOURS MJ, SWENNENE L, DI VIRGILIO F, CRONSTEIN BN, DAGNELIE PC. (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 112, 358–40.

BRELAZ-DE-CASTRO MC; DE ALMEIDA AF; DE OLIVEIRA AP. (2012) Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol.*; 279 :180-186.

BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS, WEINRAUCH Y, ZYCHLINSKY A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.

BURNSTOCK G, VERKHRATSKY A. (2010) Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis.* 1:e9.

BURNSTOCK G. (2012) Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. *Br J Pharmacol.* 167(2):238-55.

CARLSEN ED, HAY C, HENARD CA, POPOV V, GARG NJ, SOONGB L. (2013) *Leishmania amazonensis* Amastigotes Trigger Neutrophil Activation but Resist Neutrophil Microbicidal Mechanisms. *Infection and Immunity* p. 3966 –3974 Vol81

CARVALHO PL, PASSOS TS, JESUS RA. (2005) Immunopathogenesis of tegumentary leishmaniasis. *Gaz Med Bahia* , 1:57-65.

CARVALHO LP, PASSOS S, SCHRIEFER A, CARVALHO EM. (2012) Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol.*; 3: 301.

CHANG KP. (1981) Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am .J. Trop. Med.Hyg.* 30, 322–333.

CHARMOY M, BRUNNER-AGTEN S, AEBISCHER D, AUDERSET F, LAUNOIS P, MILON G, PROUDFOOT AE, TACCHINI-COTTIER F. (2010) Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.* 6, 1-12.

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. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 288-299.

CHAVES SP, TORRES-SANTOS EC, MARQUES C, FIGLIUOLO VR, PERSECHINI PM, COUTINHO-SILVA R, ROSSI-BERGMANN B. (2009) Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. *Microbes.Infect.* 11, 842-849.

CHEN Y, CORRIDEN R, INOUE Y, YIP L, HASHIGUCHI N, ZINKERNAGEL A, NIZET V, INSEL PA, JUNGER WG. (2006) ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science.* 15;314(5806):1792-5.

CHENG SS, LAI JJ, LUKACS NW, KUNKEL SL. (2001) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor up-regulates CCR1 in human neutrophils. *J.Immunol.* 166, 1178-1184.

CHORILLI M, MICHELIN DC, SALGADO HRN. (2007) Animais de laboratório: o camundongo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 28, 11-23.

CHUNG WC, KERMODE JC. (2005) Suramin disrupts receptor-G protein coupling by blocking association of G protein alpha and betagamma subunits. *J Pharmacol Exp Ther.* 313(1):191-8.

COLMENARES M, CORBÍ AL, TURCO SJ, RIVAS L. (2004) The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J Immunol.* 172, 1186-1190.

CORRIDEN R, INSEL PA. (2012) New insights regarding the regulation of chemotaxis by nucleotides, adenosine, and their receptors. *Purinergic Signalling* 8:587–598

CORRIDEN R, CHEN Y, INOUE Y, BELDI G, ROBSON SC, INSEL PA, JUNGER WG. (2008) Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine. *J Biol Chem.* 283(42):28480-6. Epub 2008 Aug 18.

COUTINHO SG, DA-CRUZ AM, BERTHO AL, SANTIAGO MA, DE-LUCA P. (1998) Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*; 31: 139-142.

COXON A, RIEU P, BARKALOW FJ, ASKARI S, SHARPE AH, VON ANDRIAN UH, ARNAOUT MA, MAYADAS TN. (1996) A novel role for the b2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity.* 5, 653–666.

CRONSTEIN BN, DAGUMA L, NICHOLS D, HUTCHISON AJ, E WILLIAMS M. (1990) The Adenosine/Neutrophil Paradox Resolved: Human Neutrophils Possess Both A1 and A2 Receptors that Promote Chemotaxis and Inhibit O2 Generation, Respectively. *The American Society for Clinical Investigation, Inc Volume 85*, 1150-1157.

CRONSTEIN BN, LEVIN RI, PHILIPS M, HIRSCHHORN R, ABRAMSON SB, EISSMANN G. (1992) Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A<sub>1</sub> receptors and inhibited via adenosine A<sub>2</sub> receptors. *JIMMUNOL.* 148(7):2201-6

CRONSTEIN BN, ROSE FR, PUGLIESE C. (1989) Adenosine, a cytoprotective autocoid: effects of adenosine on neutrophil plasma membrane viscosity and chemoattractant receptor display. *Biochim Biophys Acta.* 28;987(2):176-80.

DA-CRUZ AM, CONCEIÇÃO-SILVA F, BERTHO AL, COUTINHO SG. (1994) Leishmania-reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 62: 2614-2618.

DARASHCHONAK N, KOEPEL B, BOGDANOVA N & VON VERSEN-HÖYNCK F. (2014) Adenosine A<sub>2B</sub> receptors induce proliferation, invasion and activation of cAMP response element binding protein (CREB) in trophoblast cells. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 14:2

D'ARCY HP, YOUNG MR. (1975) Interference with normal phagosome-lysosome fusion in macrophages, using ingested yeast cells and suramin. *Nature* 256:47-49

DARSAUD A, CHEVRIER C, BOURDON L, DUMAS M, BUGUET A, BOUTEILLE B. (2004) Megazol combined with suramin improves a new diagnosis index of the early meningo-encephalitic phase of experimental African trypanosomiasis. *Trop Med Int Health.* 9(1):83-91.

DAVID CV, CRAFT N. (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol and Therapy.*; 22: 491-502

DE OLIVEIRA C, BARRAL-NETTO M. (2005) O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. *Gaz Med Bahia* , 75:35-45.

DE OLIVEIRA CI, TEIXEIRA MJ, TEIXEIRA CR, DE JESUS JR, ROSATO AB, DA SILVA JS, BRODSKYN C, BARRAL-NETTO M E BARRAL A. (2004) *Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice. *Microbes and Infection* 6 977–984.

DE SOUZA CARMO EV, KATZ S, BARBIÉRI CL. (2010) Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PLoS One*. 5, 1-10.

DEAGLIO S, DWYER KM, GAO W, FRIEDMAN D, USHEVA A, ERAT A, CHEN JF, ENJOYOJI K, LINDEN J, OUKKA M, KUCHROO VK, STROM TB, ROBSON SC. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204:1257-1265.

DEANE, G. (1938). Aspectos interessantes da fagocitose observados na leishmaniose visceral e na malária. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 33.

ELLIOTT MR, CHEKENI FB, TRAMPONT PC, LAZAROWSKI ER, KADL A, WALK SF, PARK D, WOODSON RI, OSTANKOVICH M, SHARMA P, LYSIAK JJ, HARDEN TK, LEITINGER N & RAVICHANDRAN KS. (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 10; 461(7261):282-6.

ELTZSCHIG HK, ECKLE T, MAGER T, KÜPER N, KARCHER C, WEISSMÜLLER T, BOENGLER K, SCHULZ R, ROBSON SC, COLGAN SP. ATP (2006) Release From Activated Neutrophils Occurs via Connexin 43 and Modulates Adenosine-Dependent Endothelial Cell Function. *Circulation Research*, October 3.

FALCÃO SAC, WEINKOPFF T, HURRELL BP, CELES FS, CURVELO RP, PRATES DB. (2015) Exposure to *Leishmania braziliensis* Triggers Neutrophil Activation and Apoptosis. *PLoS Negl Trop Dis* 9(3): e0003601. doi:10.1371/journal.pntd.

FAURSCHO M, BORREGAARD N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5, 1317–1327.

FIGUEIREDO AB, SERAFIM TD, MARQUES-DA-SILVA EA, MEYER-FERNANDES JR E AFONSO LCC. (2012) *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation. *Eur. J. Immunol.* 42: 1203–1215

FILARDY AA, PIRES DR, NUNES MP, TAKIYA CM, FREIRE-DE-LIMA CG, RIBEIRO-GOMES FL, DOSREIS GA. (2010) Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J. Immunol.* 185, 2044-2050.

FOLLADOR I, ARAUJO C & BACELLAR O. (2002) Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis.* 34: 54-58.

FONSECA SG, ROMÃO PR, FIGUEIREDO F, MORAIS RH, LIMA HC, FERREIRA SH, CUNHA FQ. (2003) TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol.*33(8):2297-306.

FOSSATI G, MAZZUCHELLI I, GRITTI D, RICEVUTI G, EDWARDS SW, MOULDING DA, ROSSI ML. (1998) *In vitro* effects of GM-CSF on mature peripheral blood neutrophils. *Int. J. Mol. Med.* 1, 943-951.

FREITAS-TEIXEIRA PM, SILVEIRA-LEMONS D, GIUNCHETTI RC, BARATTA-MASINI A, MAYRINK W, PERUHYPE-MAGALHÃES V, ROCHA RD, CAMPI-AZEVEDO AC, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO AO. (2012) Distinct pattern of immunophenotypic features of innate and adaptive immunity as a putative signature of clinical and laboratorial status of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol.*; 76(4):421-432.

GONTIJO CMF, DA SILVA ES, DE FUCCIO MB, DE SOUSA MCA, PACHECO RS, DIAS ES, ANDRADE-FILHO JD, BRAZIL RP, MELO MN. (2002) Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop.*; 81: 143-150.

GONZÁLEZ U, PINART M, RENGIFO-PARDO M, MACAYA A, ALVAR J, TWEED JA. (2009) Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *The Cochrane Library* Issue 2.

GREVELINK SA, LERNER EA. (1996) Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 34: 257-272. Review.

GRIMALDI JR, TESH RB, MCMAHON-PRATT D. (1989) A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *American J of Trop Med and Hyg.* 41: 687-725.

GUTIERREZ Y, SALINAS GH, PALMA G, VALDERRAMA LB, SANTRICH CV, SARAIVA NG. (1991) Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *American J Trop Med Hyg.* 45: 281-289.

HAGER M, COWLAND JB, BORREGAARD N. (2010) Neutrophil granules in health and disease. *J. Intern. Med.* 268, 25–34.

HAVENGA MJ, VAN DAM B, GROOT BS, GRIMBERGEN JM, VALERIO D, BOUT A, QUAX PH. (2001) Simultaneous detection of NOS-3 protein expression and nitric oxide production using a flow cytometer. *Anal Biochemistry*; 290: 283-291.



HERWALDT BL, BERMAN JD. (1992) Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *American J Trop Med Hyg.*; 46: 296-306.

HOFER S, IVARSSON L, STOITZNER P, AUFFINGER M, RAINER C, ROMANI N, HEUFLER C. (2003) Adenosine slows migration of dendritic cells but does not affect other aspects of dendritic cell maturation. *J. Invest Dermatol.* 121, 300-307.

HORTA MF, MENDES BP, ROMA EH, NORONHA FS, MACEDO JP, OLIVEIRA LS, DUARTE MM, VIEIRA LQ. (2012) Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J.Parasitol.Res.* 2012, 1-11.

HUYNH ML, FADOK VA & HENSON PM. (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 109(1):41-50. PubMed PMID: 11781349.

JACOBSON KA, GAO ZG. (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat.Rev.Drug Discov.* 5, 247-264.

JOHN B, HUNTER CA. (2008) Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses?. *Science.* 15, 917-918.

JONES DE, ACKERMANN MR, WILLE U, HUNTER CA, SCOTT P. (2002) Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect Immun.* 70, 2151-2158.

JONES DE, BUXBAUM .U, SCOTT P. (2000) IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 165, 364-372.

KAVOOSI G, ARDESTANI S, KARIMINIA A, ABOLHASSANI M, TURCO S. *Leishmania major*: Reactive oxygen species and interferon gamma induction by soluble lipophosphoglycan of stationary phase promastigotes. *Exp Parasitol.* 2006; 114 (4): 323-328.

KAVOOSI G, ARDESTANI SK, KARIMINIA A. (2009) The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitol.* 136: 1193-1199.

KAVOOSI G, ARDESTANI SK, KARIMINIA A, ALIMOHAMMADIAN MH. (2010) *Leishmania major* lipophosphoglycan: Discrepancy in toll-like receptor signaling. *Exp Parasitol.* 124: 214-218.

KAWA H, SABROZA PC, OLIVEIRA RM, BARCELLOS C. (2010) Production of transmission foci for cutaneous leishmaniasis: the case of Pau da Fome, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Publica.* 26: 1495-1507.

KEESEN TSL, ANTONELLI LRV, FARIA DR, GUIMARÃES LH, BACELLAR O, CARVALHO EM, DUTRA WO, GOLLOB KJ. (2011) CD4+ T cells defined by their Vb T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. *Clin and Exp Immunol.* 165: 338–351.

- KOBAYASHI SD, DELEO FR. (2009) Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev. Syst. Biol. Med.* 1, 309-333.
- KOBAYASHI SD, JOVANKA MV, CASSANDRA LB, ROBERT MS, FRANK RD. (2002) Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 6901–6906.
- KOJIMA H, SAKURAI K, KIKUCHI K, KAWAHARA S, KIRINO Y, NAGOSHI H, HIRATA Y, NAGANO T. (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.*; 46: 373-375.
- KOPF M, BROMBACHER F, KÖHLER G, KIENZLE G, WIDMANN KH, LEFRANG K, HUMBORG C, LEDERMANN B, SOLBACH W. (1996) IL-4-deficient BALB/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J.Exper.Med.* 184, 1127-1136.
- KRECKLER LM, WAN TC, GE ZD & AUCHAMPACH JA. (2005) Adenosine Inhibits Tumor Necrosis Factor- Release from Mouse Peritoneal Macrophages via A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> but Not the A<sub>3</sub> Adenosine Receptor. *JPET* 317:172–180
- KROPF P, FREUDENBERG MA, MODOLELL M, PRICE HP, HERATH S, ANTONIAZI S, GALANOS C, SMITH DF, MULLER I. (2004) Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.* 72, 1920–1928.
- LA SALA A, FERRARI D, CORINTI S, CAVANI A, DI VIRGILIO F, GIROLOMONI G. (2001) Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J.Immunol.* 166, 1611-1617.
- LA SALA A, FERRARI D, DI VIRGILIO F, IDZKO M, NORGAUER J, GIROLOMONI G. (2003) Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J.Leukoc.Biol.* 73, 339-343.
- LA SALA A, SEBASTIANI S, FERRARI D, DI VIRGILIO F, IDZKO M, NORGAUER J, GIROLOMONI G. (2002) Dendritic cells exposed to extracellular adenosine triphosphate acquire the migratory properties of mature cells and show a reduced capacity to attract type 1 T lymphocytes. *Blood* 99, 1715-1722.
- LAINSON R, SHAW JJ. (1987) Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis. *Academic Press Inc.*; 1-20.
- LASKAY T, VAN ZANDBERGEN G, SOLBACH W. (2003) Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11, 210-214.
- LEDDEROSE C, BAO Y, ZHANG J, JUNGER WG. (2015) Novel method for real-time monitoring of ATP release reveals multiple phases of autocrine purinergic signalling during immune cell activation. *ActaPhysiol.* 213, 334–345

LEVY BD, CLISH CB, SCHMIDT B, GRONERT K, SERHAN CN. (2001) Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol.* 2(7):612-9.

LEY K, LAUDANNA C, CYBULSKY MI, NOURSHARGH S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Rev. Immunol.* 7, 678–689.

LINDEN J. (2001) Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:775-787

LOVRIEN R., WILLIAM K.K., FERREY M.K., AMMED D.A., (1989) *App. Environ. Microbiol.* 53, 2935.

MACRAE EK, PRYZWANSKY KB. (1984) Phagocytosis of zymosan by human neutrophils. *Carlsberg Research Commun.* 49, 315-322.

MAGALHÃES AV, MORAES MAP, RAICK AN. (1986) Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev do Inst de Med Trop de São Paulo.*; 28: 253–62.

MAHAMED DA, TOUSSAINT LE, BYNOE MS. (2015) CD73-Generated Adenosine Is Critical for Immune Regulation during *Toxoplasma gondii* Infection. *Infect Immun* 83:721–729.

MARCUS AJ, BROEKMAN MJ, DROSOPOULOS JH, ISLAM N, PINSKY DJ, SESTI C, LEVI R. (2003) Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305:9-16.

MARQUES DA SILVA C, CHAVES MM , RODRIGUES JC , CORTE-REAL S , COUTINHO-SILVA R, PERSECHINI PM. (2011) Differential Modulation of ATP-Induced P2X7-Associated Permeabilities to Cations and Anions of Macrophages by Infection with *Leishmania amazonensis*. *Plos One Vol 6* e25356.

MARZOCHI MCA, MARZOCHI KBF. (1994) Proposta de uma classificação clínica simplificada para as leishmanioses tegumentares do novo mundo. *Rev da Soc Brasileira de Med Trop.*; 27 (supl. 1): 91.

MASSARI P, HO Y, WETZLER LM. (2000) *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;97(16):9070-5

MASTEJ K, ADAMIEC R. (2008) Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. *Acta Diabetol.* 45, 183–190.

MCFARLANE E, PEREZ C, CHARMOY M, ALLENBACH C, CARTER KC, ALEXANDER J, TACCHINI-COTTIER F. (2008) Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* 76, 532-541.

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?. *Immun. Rev.* 201, 206–224.

MENEGHIN A, HOGABOAM CM. (2007) Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J. Clin. Invest.* 117, 530-538.

MENON JN, BRETSCHER PA (1996) Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to *Leishmania major* following exposure to low doses of *L. major* and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. *Eur J Immunol* 26: 243–249.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, Diagnóstico Clínico e diferencial, primeira edição. Brasília-DF, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>> Acesso em: 20 de março de 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, segunda edição. Brasília-DF, 2007.*

MIZUMOTO N, KUMAMOTO T, ROBSON SC, SEVIGNY J, MATSUE H, ENJYOJI K, TAKASHIMA A. (2002) CD39 is the dominant Langerhans cell associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat.Med.* 8, 358-365.

MOSER B, WILLIMANN K. (2004) Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis.* 6, ii84-ii89.

MUSKUS CE, MARÍN VILLA M. (2002) Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica.* 22(2):167-77.

NATHAN C, SHILOH MU. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 8841-8848.

NOVAIS FO, SANTIAGO RC, BÁFICA A, KHOURI R, AFONSO L, BORGES VM, BRODSKYN C, BARRAL-NETTO M, BARRAL A, DE OLIVEIRA CI. (2009) Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J. Immunol.* 15, 8088-8098

NUSSLER AK, BILLIAR TR. (1993) Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J.Leuk.Biol.* 54, 171-178.

NUUTILA J, LILIUS EM. (2005) Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry A.* 65, 93-102.

OHTA A, SITKOVSKY M. (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature.* 20-27;414(6866):916-20.

OKWOR BI, JIA P, MOU Z, ONYILAGHA C E UZONNA JE. (2014) CD8+ T cells Are Preferentially Activated during Primary Low Dose Leishmania major Infection but Are Completely Dispensable during Secondary Anti-Leishmania Immunity. . *PLoS Negl Trop Dis* 8(11)

PANTHER E, CORINTI S, IDZKO M, HEROUY Y, NAPP M, LA SALA A, GIROLOMONI G, NORGAUER J. (2003) Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 101, 3985-3990.

PAPAYANNOPOULOS V, ZYCHLINSKY A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 30, 513–521 (2009).

PARKER LC, WHYTE MK, DOWER SK, SABROE I. (2005) The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J. Leukoc. Biol.* 77, 886–892.

PASSOS VM, FALCÃO AL, MARZOCHI MC, GONTIJO CM, DIAS ES, BARBOSA-SANTOS EG, GUERRA HL, KATZ N. (1993) Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 88: 103-110.

PEARSON RD, SOUSA AQ. (1996) Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.*; 22: 1-13. Review.

PEARSON RD, STEIGBIGEL RT (1981) Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *J.Immunol.* 127, 1438–1443

PELLEGATTI P, FALZONI S, PINTON P, RIZZUTO R, DI VIRGILIO F. (2005) A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell.* 16(8):3659-65

PESANTI EL. (1978) Suramin effects on macrophage phagolysosome formation and antimicrobial activity. *Infect Immun.* 20(2):503-11. PubMed PMID: 669808

PETERS NC, SACKS DL. (2009) The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.* 11, 1290-1296.

PETERS NC, EGEN JG, SECUNDINO N, DEBRABANT A, KIMBLIN N, KAMHAWI S, LAWYER P, FAY MP, GERMAIN RN, SACKS D. (2008) *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 321, 970-974.

PHILLIPSON M, KUBES P (2011) The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Med.* 17, 1381–1390.

PINTO-DA-SILVA LH, CAMURATE M, COSTA KA, OLIVEIRA SMP, CUNHA-E-SILVA NL & SARAIVA EMB. (2002) *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. *International Journal for Parasitology.* 32: 1371–1377.

PIRMEZ C, COOPER C, PAES-OLIVEIRA M, SCHUBACH A, TORIGIAN VK, MODLIN RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol.* 1990; 145: 3100–4.

QUARESMA, PF. Estudo da Leishmaniose Tegumentar na Terra Indígena Xakriabá: o parasito, os hospedeiros e os vetores. *Tese (Doutorado em Ciências da Saúde na área de Concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias)* - Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou - Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <http://arca.icict.fiocruz.br/handle/icict/5505>. Acessado em 25 de fevereiro 2014.

RASKOVALOVA T, HUANG X, SITKOVSKY MV. (2005) Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *J Immunol* 175:4383–4391

REGATEIRO FS, HOWIE D, NOLAN KF, AGOROGIANNIS EI, GREAVES DR, COBBOLD SP, WALDMANN H. (2011) Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- $\beta$ . *Eur J Immunol.* 41(10):2955-65.

REUTERSHAN J, VOLLMER I, STARK S, WAGNER R, NGAMSRI KC & ELTZSCHIG HK. (2009) Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *TheFASEBJournal.* Vol. 23

RIBEIRO-GOMES FL, SACKS D. (2012) The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect.Microbiol.* 2, 1-8.

RIBEIRO-GOMES FL, OTERO AC, GOMES NA, MONIZ-DE-SOUZA MC, CYSNE-FINKELSTEIN L, ARNHOLDT AC, CALICH VL, COUTINHO SG, LOPES MF, DOSREIS GA. (2004) Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J.Immunol.* 172, 4454-4462.

RIBEIRO-GOMES FL, PETERS NC, DEBRABANT A, SACKS DL. (2012) Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS.Pathog.* 8, 1-12.

ROSENTHAL LA, SUTTERWALA FS, KEHRLI ME, MOSSER DM. (1996) *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect. Immun.* 64, 2206–2215.

ROUSSEAU D, DEMARTINO S, FERRUA B, MICHIELS JF, ANJUÈRE F, FRAGAKI K, LE FICHOUX Y, KUBAR J. (2001) *In vivo* involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *B.M.C. Microbiol.* 1: 1-17.

RYAN GB, MAJNO G. (1977) Acute inflammation. *Am. J. Pathol.* 86, 183-276.

SAFAIYAN S, BOLHASSANI A, NYLEN S, AKUFFO H, RAFATI S. (2011) Contribution of human neutrophils in the development of protective immune response during *in vitro* *Leishmania major* infection. *Parasite Immunol.* 33, 609-620.

SALLUSTO F, MACKAY CR, LANZAVECCHIA A. (2000) The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 593-620.

SCHACHNIK NCC, DUSSE LMS, MARTINS-FILHO OAO, PERUHYPE-MAGALHÃES VP. Uso da citometria de fluxo para análise de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com nefropatia crônica do enxerto. *Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.* 2008.

SACKS DL. (1989) Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.* 69(1):100-3.

SCHULTE G, FREDHOLM BB. (2003) Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.* 15, 813-827.

SEGAL AW. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annual Rev.Immunol.* 23, 197-223.

SEREZANI CH, BALLINGER MN, ARONOFF DM, PETERS-GOLDEN M. (2008) Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 39, 127-132.

SES-MG. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.saude.mg.gov.br>> Acessado em 14 de maio de 2014.

SHARMA N, NORMAN-O'GUIN K, SHAFIT-ZAGARDO B. (2004) Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and inhibitors of protein kinase C alter glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA levels. *Glia.* 4, 572-579.

SHARMA U, SINGH S. (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45, December, pp. 255–272

SHIMABUKURO PHF, SILVA TRR, RIBEIRO FOF, BATON LA, GALATI EAB. (2010) Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors.*; 3: 121.

SILVA-JÚNIOR IA, MORATO CI, QUIXABEIRA VBL, PEREIRA LIA, DORTA ML, OLIVEIRA MAP, HORTA MF & DIAS FR. (2015) In Vitro Metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. *BioMed Research International* Volume, Article ID 393049, 15 pages

SILVEIRA FT, LAINSON R, CORBETT CE. (2004) Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99: 239-51.

SIPKA S, DANK K, NAGY PI, TASKO V, CZIRJFIK L, E SZEGEDI G. (1991) Effects of suramin on phagocytes in vitro. *Ann Hematol* 63:45-48

SMALLEY DM, LEY K. (2005) L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 255–266.

SOONG L, CHANG CH, SUN J, LONGLEY BJR, RUDDLE NH, FLAVELL RA, MCMAHON-PRATT D. (1997) Role of CD4<sup>+</sup> T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 158, 5374-5383.

STRIJDOM H, MULLER C, LOCHNER A. (2004) Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *J of Mol and Cell Cardiology.*; 37: 897-902.

SULLIVAN GW, LEE DD, ROSS WG, DIVIETRO JA, LAPPAS CM, LAWRENCE MB, LINDEN J. (2004) Activation of A2A adenosine receptors inhibits expression of alpha 4/beta 1 integrin (very late antigen-4) on stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 75,127-134.

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

TAKEDA K, AKIRA S. (2004) TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3-9.

TAKEUCHI K, UMEKI Y, MATSUMOTO N, YAMAMOTO K, YOSHIDA M, SUZUKI K, ARATANI Y. (2012) Severe neutrophil-mediated lung inflammation in myeloperoxidase-deficient mice exposed to zymosan. *Inflamm. Res.* 61, 197-205.

THALHOFER CJ, CHEN Y, SUDAN B, LOVE-HOMAN L, WILSON ME. (2011) Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infect. Immun.* 79, 108-117.

TRAN SL, PUHAR A, NGO-CAMUS M, RAMARAO N. (2011) Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS One.* 6(9):e22876.

TSUDA Y, TAKAHASHI H, KOBAYASHI M, HANAFUSA T, HERNDON DN, SUZUKI F. (2004) Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity.* 21, 215-226.

VAN CALKER D, MÜLLER M, HAMPRECHT B. (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem.* 33(5):999-1005.

VAN DER HOEVEN D, WAN TC E AUCHAMPACH TC. (2008) Activation of the A3 Adenosine Receptor Suppresses Superoxide Production and Chemotaxis of Mouse Bone Marrow Neutrophils. *Mol Pharmacol.* September ; 74(3): 685

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. *J. Immunol.* 173, 6521-6525.



VASCONCELOS RM, LEITE FC, LEITE JA, RODRIGUES MASCARENHAS S, RODRIGUES LC, PIUVEZAM MR. (2012) Synthesis, acute toxicity and anti-inflammatory effect of bornyl salicylate, a salicylic acid derivative. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 34, 1028-1038.

VIANA KF, AGUIAR-SOARES RD, ROATT BM, RESENDE LA, DA SILVEIRA-LEMOS D, CORRÊA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO OA, MOURA SL, ZANINI MS, ARAÚJO MS, REIS AB, GIUNCHETTI RC. (2013) Analysis using canine peripheral blood for establishing in vitro conditions for monocyte differentiation into macrophages for *Leishmania chagasi* infection and T-cell subset purification. *Vet Parasitol*. 15;198(1-2):62-71.

VOULDOUKIS I, MAZIER D, DEBRÉ P, MOSSALAYI MD. (1995) Nitric oxide and human infectious diseases. *Res Immunol*. Nov-Dec;146(9):689-92.

WEIGLE K, SARAVIA NG. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 1996; 14: 433-450.

WHO–World Health Organization. (2013) WHO Model List of Essential Medicines. 18th edition Essential Medicines

WHO–World Health Organization. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/disease epidemiology/en/print.html](http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/print.html)> Acessado em 25 de fevereiro de 2015.

YEGUTKIN GG, ICHIHARA FM, KARIKOSKI M, NIEMELA J, LAURILA JP, ELIMA K, JALKANEN S & SALMI M. (2011) Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur. J. Immunol*. 41: 1231–1241

ZHONG Y, WEININGER M, PIRBHAI M, DONG F, ZHONG G. (2006) Inhibition of staurosporine-induced activation of the proapoptotic multidomain Bcl-2 proteins Bax and Bak by three invasive chlamydial species. *J Infect*. 53(6):408-14.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 265 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Avaliação in vitro da resposta imune e dos receptores purinérgicos em neutrófilos infectados por Leishmania sp, de camundongos C57BL/6”, que tem como responsável Rodolfo Cordeiro Giunchetti, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 02/12/2014. Este certificado espira-se em 02/12/2019.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 265 / 2014, related to the Project entitled “In vitro evaluation of immune response and purinergic receptors in neutrophils infected with Leishmania sp, from C57BL/6 mice”, under the supervision of Rodolfo Cordeiro Giunchetti, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 02/12/2014. This certificates expires in 02/12/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 02/12/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)