

Louisa Maria de Andrade e Sousa

**Neutrófilos têm um papel protetor durante os
estágios iniciais da infecção por *Leishmania
amazonensis* em camundongos BALB/c**

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

2013

Louisa Maria de Andrade e Sousa

**Neutrófilos têm um papel protetor durante os
estágios iniciais da infecção por *Leishmania
amazonensis* em camundongos BALB/c**

**Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e
Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção
do título de Doutor em Imunologia.**

**Área de concentração: Imunologia de doenças
infecciosas.**

Orientadora: Prof. Dra. Leda Quercia Vieira.

Belo Horizonte

2013

A Robson, Maristela, Alberto e Maria Eduarda.

AGRADECIMENTOS

À Professora Leda Quercia Vieira, pela oportunidade, pela orientação, pela dedicação, pelos conselhos.

Ao Professor David M. Mosser, pela oportunidade, pelas discussões, pelo direcionamento e por dar condições para a realização de uma série de experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, pelas oportunidades que me proporcionou.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado sanduiche e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia pelas disciplinas, pelas discussões, pelas ajudas, enfim pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos membros da banca de doutorado, por terem aceitado a tarefa de discutir e contribuir para aprimorar este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, por estarem sempre dispostos a resolver os problemas com os quais nos deparamos.

À minha querida aluna de iniciação científica, Magda, e ao meu grande amigo Matheus, pelo trabalho duro e dedicação, sem os quais a execução deste trabalho seria impossível. Aos meus colaboradores Liliane, Leonardo e Paula, que também são muito responsáveis por tornar este trabalho possível. Sou eternamente grata a vocês por toda a energia dedicada e pela amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, pela ajuda, paciência e amizade. Destaco aqui a importância de Daniel Manzoni, Caio e Waldionê. Eu só tenho a agradecer a vocês pela disponibilidade, por todas as ajudas fora de hora, por todo o material emprestado, pelas conversas mais que engraçadas, enfim por tudo!

Aos meus queridos amigos: Angélica, Juliana, Irma, Daniel Cisalpino e Natássia, pela força que me deram, por me dar abrigo e carinho.

Finalmente agradeço às pessoas mais importantes da minha vida. Ao meu marido, Robson, pelo suporte emocional, logístico e até mesmo na realização de experimentos. Seu amor, companheirismo, paciência e dedicação foram essenciais para que eu conseguisse completar esta etapa. À minha querida família, Alberto, Maristela e Maria Eduarda pelo amor e carinho, pelo apoio incondicional e pelo suporte emocional e logístico.

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”.**

Albert Einstein

RESUMO

Neutrófilos estão envolvidos nos estágios iniciais da resposta imune a patógenos. Neste trabalho, nós investigamos o papel dos neutrófilos durante o estabelecimento da infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos BALB/c e C57BL/6. Primeiramente, nós mostramos que há um intenso influxo de neutrófilos para as orelhas após 6 horas de infecção, com máximo acúmulo de neutrófilos ocorrendo entre 6 e 24 horas. Para investigar o papel dos neutrófilos no momento da infecção, nós depletamos tais células utilizando os anticorpos monoclonais RB6-8C5 ou 1A8. A depleção de neutrófilos levou a um desenvolvimento acelerado de lesões, associado com aumentado número de parasitas e uma maior atividade de arginase em camundongos BALB/c, mas não em camundongos C57BL/6. O aumento na susceptibilidade foi acompanhado por um aumento nos níveis de anti-*L. amazonensis* IgG1 e IgG2a e aumentada produção de IL-10. A inibição da sinalização via IL-10, utilizando anti-IL-10R, aboliu o aumento na carga de parasitas observado em camundongos depletados de neutrófilos, sugerindo que a proliferação do parasita em camundongos depletados de neutrófilos é mediada por IL-10. O aumento nos níveis de IL-10 nos parece ser pelo menos parcialmente dependente do aumento dos níveis de IgG, uma vez que mostramos *in vitro* que os imunocomplexos induziram a produção de IL-10 por macrófagos e somado a isto o tratamento *in vivo* com anti-FcγR, que bloqueia a sinalização por imunocomplexos, reverteu o aumento nos níveis de IL-10. É importante destacarmos que o próprio parasita também foi capaz de induzir a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS ou HA por uma via dependente de ERK, e que este aumento de IL-10 favoreceu a replicação do parasita no interior dos macrófagos. O efeito da IL-10 sobre a replicação do parasita não parece ser exercido por meio de inibição da produção de IL-12, TNF-α ou óxido nítrico, nem por indução da atividade da enzima arginase. Além disso, a depleção de neutrófilos reduziu o acúmulo de células T regulatórias, que são capazes de restringir o desenvolvimento de lesões durante os estágios iniciais da infecção por *L. amazonensis*. Assim, em resumo a presença dos neutrófilos no momento da infecção por *L. amazonensis* garante a eliminação do parasita, o controle da produção de anticorpos e de citocinas, principalmente IL-10 que atua diretamente sobre os macrófagos favorecendo a replicação do parasita, e a manutenção de células T regulatórias no local da infecção, favorecendo o controle dos níveis de parasitas e do desenvolvimento de lesões em camundongos BALB/c.

Palavras-chave: Neutrófilo, resposta imune, *Leishmania amazonensis*, IL-10.

ABSTRACT

Neutrophils are involved in early stages of immune response to pathogens. In the present work, we investigated the role of neutrophils during the establishment of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c and C57BL/6 mice. First, we have shown that there is an intense influx of neutrophils to the ears as early as 6 h after infection; maximum neutrophil accumulation was observed between 6 and 24 h. To investigate the role of neutrophils at the time of infection, we depleted neutrophils using either RB6-8C5 or 1A8 monoclonal antibodies. Neutrophil depletion lead to faster lesion development, associated with increased parasite numbers and higher arginase activity in BALB/c mice, but not in C57BL/6 mice. Increased susceptibility was also accompanied by augmented level of anti-*L. amazonensis* IgG1 and IgG2a production and increased production of IL-10. Inhibition of IL-10 signaling using anti-IL-10R abrogated the increase in parasite loads observed in neutrophil depleted mice, suggesting that parasite proliferation observed in the absence of neutrophils is mediated by IL-10. The increase in IL-10 levels seems to be at least in part dependent on the increase in IgG levels, since we have shown in vitro that immune complexes induce IL-10 production by macrophages and we have also demonstrated that treatment in vivo with anti-Fc γ R, which blocks immune complexes signaling, abolished the increase in IL-10 levels. Besides, promastigote forms of *L. amazonensis* were also able to induce IL-10 production by macrophages stimulated with LPS or HA by an ERK-dependent mechanism and this increase in IL-10 levels favored parasite replication inside its host cell. The effects of IL-10 on parasite replication do not seem to be caused by inhibition of IL-12, TNF- α or nitric oxide production, nor by the induction of arginase activity. Besides, neutrophil depletion reduced the accumulation of regulatory T cells, which are known to restrain lesion development during early *L. amazonensis* infection. Taken together, our data indicate that the presence of neutrophils at the time of infection guarantees parasite elimination, controls the productions of antibodies and cytokines, specially IL-10 that acts directly on macrophages favoring parasite growth, and maintains appropriate levels of regulatory T cells at the site of infection, leading to control of parasite numbers and limited lesion development during the first week of infection in BALB/c mice.

Key words: Neutrophil, immune response, *Leishmania amazonensis*, IL-10.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Resumo esquemático do papel dos neutrófilo na infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c.....97
- Figura 2:** Promastigotas de *L. amazonensis* evoluíram um mecanismo de evasão da atividade microbicida de macrófagos, no qual os parasitas induzem a produção de IL-10, que atua de maneira autócrina favorecendo a replicação do parasita.....103

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Cinética de recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção por <i>L. amazonensis</i>	54
Gráfico 2: Curso de infecção após a depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c e C57BL/6.....	58
Gráfico 3: A depleção de neutrófilos aumenta a carga de parasitas e a atividade de arginase em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>	61
Gráfico 4: Efeito da depleção de neutrófilos sobre a secreção de IL-4, IFN- γ , IL-10 e IL-17 por células dos linfonodos drenantes da lesão em respostas de re-estimulação antigênica <i>in vitro</i>	63
Gráfico 5: Tratamento com anticorpo monoclonal 1A8 produz resultados semelhantes ao tratamento com o anticorpo RB6-8C5.....	65
Gráfico 6: Níveis de IgG1 e IgG2a no soro de camundongos BALB/c infectados e depletados de neutrófilos.....	66
Gráfico 7: A depleção de neutrófilos altera a percentagem de células T regulatórias no local da infecção durante a primeira semana pós-infecção.....	67
Gráfico 8: O bloqueio do receptor da citocina IL-10 em camundongos depletados de neutrófilos resulta em redução da carga de parasitas nas orelhas infectadas.....	69
Gráfico 9: O aumento na produção de IL-10 em camundongos depletados de neutrófilos parece ser pelo menos parcialmente dependente do aumento nos níveis de IgG.....	71
Gráfico 10: Formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> induzem a produção de IL-10 e inibem a produção de IL-12 por macrófagos de medula óssea estimulados com LPS.....	73
Gráfico 11: Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> induzem produção de IL-10 por macrófagos estimulados com ácido hialurônico (HA).....	75
Gráfico 12: Apenas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> induzem a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS.....	76
Gráfico 13: Promastigotas de <i>L. major</i> e <i>L. braziliensis</i> são capazes de reprimir a secreção de IL-12, mas não induzem a produção de altos níveis de IL-10.....	78
Gráfico 14: O aumento da produção de IL-10 induzido pelo parasita favorece a proliferação do mesmo.....	81
Gráfico 15: Efeito do bloqueio de IL-10 sobre a produção de TNF- α e IL-12 e sobre a expressão de iNOS.....	83

Gráfico 16: A infecção de macrófagos estimulados com LPS não altera a atividade das enzimas arginase e iNOS.....	85
Gráfico 17: A produção de IL-10 induzida pelo parasita parece ser dependente da sinalização via MAP/ERK quinase.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ABTS:** Ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benz-tiazolinosulfônico
- Ag:** Antígeno
- BOD:** Demanda bioquímica de oxigênio
- BSA:** Soro albumina bovina
- CCL#:** Ligantes de receptores de quimiocinas CC
- CD#:** *Cluster of differentiation*
- CTLA4:** Antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos (*Cytotoxic T lymphocyte antigen-4*)
- CXCL#:** Ligantes de receptores de quimiocinas CXC
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DEPC:** Dietilpirocarbonato
- DNase:** Desoxiribonuclease
- DMEM:** Meio Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DTT:** Ditioneitol
- EDTA:** Ácido etileno-diamino-tetra-acético
- ELISA:** Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
- ERK:** Quinase regulada por sinais extracelulares (*Extracellular signal regulated kinase*)
- Fc:** Fração cristalizável das imunoglobulinas
- FcR γ :** Receptor para a fração Fc da IgG
- FITC:** Fluoresceína isotiocianato
- GAPDH:** Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- HA:** Ácido hialurônico
- HTAB:** Brometo de hexadeciltrimetilamônio
- IC:** Imunocomplexo
- IFN:** Interferon
- Ig:** Imunoglobulina
- IL-#:** Interleucina
- IL-10R:** receptor da citocina IL-10
- iNOS:** Óxido nítrico sintase indutível
- i.p.:** Intraperitoneal
- IP-10:** Proteína 10 induzida por IFN- γ

KC: Quimiocina derivada de queratinócitos

LPG: Lipofosfoglicano

LPS: Lipopolissacarídeo

LTB4: Leucotrieno B4

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen-activated protein kinase*)

M-CSF: Fator estimulador de colônia de macrófagos

MEK: Quinase MAPK/ERK

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

MIP-#: Proteína inflamatória de macrófagos

MMP: Metaloproteinase da matriz extracelular

MPO: Mieloperoxidase

NE: Elastase neutrofílica

NETs: *Neutrophil Extracellular Traps*

NF-κB: Fator nuclear kappa B

NK: Células exterminadoras naturais

NO: Óxido nítrico

OD: Densidade óptica

OVA: Ovalbumina

PAF: Fator de agregação plaquetária

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

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

PGE2: Prostaglandina E2

PI3K: Fosfoinositídeo 3-quinase

PPD: p-fenilenediamina

RAG: Gene ativador da recombinação

RANTES: *Regulated and normal T cell expressed and secreted*

RNase: Ribonuclease

RPMI: Meio do Instituto Roswell Park Memorial

RT-PCR: Reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

SBF: Soro bovino fetal

SOCS#: Proteína supressora da sinalização de citocinas

SSA: Solução saturada de sulfato de amônia

STAT#: Proteína transdutora do sinal e ativadora da transcrição

TGF: Fator de crescimento transformante

Th#: Células T auxiliares do tipo #

TIGIT: Imunoreceptor de células T com domínios IgG e ITIM

TMB: Tetrametilbenzina

TNF: Fator de necrose tumoral

Treg: células T regulatórias

U: Unidades

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – As leishmanioses.....	18
1.1.1 – Resposta imune a <i>Leishmania major</i> : um modelo para o estudo da imunidade nas infecções por <i>Leishmania</i>	19
1.1.2 – Resposta imune a <i>Leishmania amazonensis</i>	21
1.2 – Papel da citocina IL-10 na resposta a <i>Leishmania</i>	24
1.3 – Neutrófilos.....	26
1.3.1 – Funções na imunidade inata.....	26
1.3.2 – Funções na imunidade adquirida.....	28
1.3 – Participação dos neutrófilos nas infecções por <i>Leishmania</i>	29

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral.....	34
2.2 – Objetivos específicos.....	34

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais.....	36
3.2 – Parasitos.....	36
3.3 –Preparo de antígeno de <i>Leishmania</i>	38
3.4 – Infecção por <i>Leishmania in vivo</i>	38
3.5 – Tratamento com anticorpos <i>in vivo</i>	38
3.6 – Medida da atividade de mieloperoxidase no sítio de infecção.....	40
3.7 – Imunomarcção e citometria de fluxo.....	41
3.8 – Determinação da carga da parasitas por diluição limitante.....	42
3.9 – Medida da atividade de arginase no sítio de infecção.....	43
3.10 – Cultura de linfócitos para dosagem de citocinas por ELISA.....	43
3.11 – Dosagem de IgG no soro por ELISA.....	44
3.12 – Obtenção de macrófagos de medula óssea.....	45
3.13 – Estimulação e infecção de macrófagos.....	46
3.14 – Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos.....	47
3.15 – Detecção de mRNA por transcrição reversa e PCR em tempo real.....	47
3.15.1 – Extração de RNA.....	47

3.15.2 – Síntese de cDNA.....	48
3.15.3 – Amplificação específica por Real time PCR.....	48
3.16 – Quantificação do crescimento intracelular da <i>Leishmania</i> dentro de macrófagos.....	49
3.17 – Medida da atividade de arginase e da produção de óxido nítrico por macrófagos.....	50
3.18 – Análise estatística.....	51

4 – RESULTADOS

4.1 – Cinética de recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e eficiência do tratamento com anticorpo monoclonal RB6-8C5 na prevenção do acúmulo de neutrófilos.....	52
4.2 – Neutrófilos limitam o desenvolvimento inicial de lesões em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>	56
4.3 – Neutrófilos são requeridos para o controle inicial da carga de parasitas em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>	59
4.4 – A depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c causa um aumento na secreção de IL-17 e IL-10 por células dos linfonodos drenantes durante respostas de re-estimulação antigênica.....	62
4.5 – O tratamento com o anticorpo monoclonal 1A8 produz resultados semelhantes ao encontrados no tratamento com RB6.....	64
4.6 – A depleção de neutrófilos resulta em um aumento nos títulos de IgG1 e IgG2a anti- <i>Leishmania</i> no soro de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>	66
4.7 – A presença de neutrófilos no sítio de infecção modula o acúmulo de células T regulatórias.....	67
4.8 – O aumento na produção de IL-10 induzido pela depleção de neutrófilos promove a proliferação do parasita, mas não a exacerbação da lesão.....	68
4.9 – O aumento na produção de IL-10 em camundongos depletados de neutrófilos parece ser pelo menos parcialmente dependente do aumento nos níveis de IgG.....	70
4.10 – Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> induzem a produção de IL-10 e reprimem a secreção de IL-12 por macrófagos estimulados com LPS.....	72

4.11 – Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> também induzem a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com ácido hialurônico, um estímulo inflamatório presente no local da infecção.....	74
4.12 – Apenas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> alteram as respostas de macrófagos ao estímulo com LPS.....	76
4.13 – Promastigotas de <i>L. major</i> e <i>L. braziliensis</i> são capazes de reprimir a secreção de IL-12, mas não induzem a produção de altos níveis de IL-10.....	77
4.14 – A produção de IL-10 endógena induzida pela infecção com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> favorece a replicação do parasita no interior de suas células hospedeiras.....	79
4.15 – A produção endógena de IL-10 não controla os níveis de IL-12 nem a expressão de iNOS por macrófagos estimulados com LPS e infectados com <i>L. amazonensis</i>	82
4.16 – A proliferação do parasita induzida por IL-10 não parece estar relacionada com indução da atividade de arginase ou com repressão da atividade de iNOS.....	84
4.17 – A produção de IL-10 induzida pelo parasita parece ser dependente da sinalização via MAP/ERK quinase.....	86
5 – DISCUSSÃO	88
6 – CONCLUSÃO	104
7 – REFERÊNCIAS	105

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – As leishmanioses

As leishmanioses constituem um complexo de enfermidades causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*. As infecções por tais parasitas representam um sério problema de saúde pública, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. As leishmanioses apresentam uma grande diversidade clínica e epidemiológica, representada principalmente por sua variedade de formas clínicas, que incluem desde lesões cutâneas simples até infecções viscerais letais. A leishmaniose cutânea caracteriza-se pela presença de lesões ulcerativas na pele nas regiões expostas do corpo e em mais de 90% dos casos ocorre cura espontânea após um período que varia entre 3 e 18 meses (Davies *et al.*, 2003). As espécies que causam essa forma clínica incluem *Leishmania major* e *Leishmania tropica* no Velho Mundo (Dowlati, 1996) e *Leishmania amazonensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis* no Novo Mundo (Weigle & Saravia, 1996). A leishmaniose cutânea difusa é caracterizada por uma infiltração difusa na pele, caracterizada pela presença de um grande número de nódulos, que geralmente não ulceram e se alastram por todo o corpo (Silveira *et al.*, 2004). Nestes casos não ocorre cura espontânea. São agentes causadores desta forma clínica os parasitas das espécies *Leishmania mexicana* e *L. amazonensis*. A leishmaniose cutânea difusa acomete principalmente indivíduos imunossuprimidos (Desjeux, 2004; Markle & Makhoul, 2004). Na forma mucocutânea, causada por *L. braziliensis* e *L. panamensis*, ocorrem lesões nas mucosas nasal, faríngea e laringea, que podem evoluir resultando em destruição parcial ou total do tecido envolvido, podendo gerar com o avanço da doença deformidades que excluem as vítimas de uma vida social (Ahluwalia *et al.*, 2004; Weigle & Saravia, 1996). Na leishmaniose visceral, o parasita se dissemina pelo organismo promovendo infecção generalizada, acompanhada de perda de peso, febre prolongada, diarreia, anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, hepatomegalia e esplenomegalia. A leishmaniose visceral é uma doença crônica grave, que pode ser fatal se não for tratada adequadamente (Herwaldt, 1999).

A transmissão da leishmaniose já foi reportada em 98 países em 5 continentes. No Brasil há uma elevada incidência tanto da forma cutânea quanto da forma visceral da doença.

Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. 70 a 75% da incidência global de leishmaniose cutânea ocorre em apenas dez países, sendo o Brasil um deles. A incidência anual estimada pela Organização Mundial de Saúde é de 200 a 400 mil casos de leishmaniose visceral e 0,7 a 1,2 milhão de casos de leishmaniose cutânea (Alvar *et al.*, 2012).

Os parasitas do gênero *Leishmania* são organismos que se apresentam ao longo do seu ciclo de vida sob duas formas evolutivas: a promastigota, forma extracelular flagelada livre que ocorre no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, e a amastigota, forma intracelular obrigatória de células do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado (Bates, 1994). Os hospedeiros invertebrados são as fêmeas hematófagas de flebótomos que apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo em diferentes regiões do globo sob variadas condições climáticas e de altitude. Os hospedeiros vertebrados incluem grande número de espécies dos mais variados grupos de mamíferos, como marsupiais, edentados, roedores, canídeos e primatas, inclusive o homem.

A infecção por *Leishmania* ocorre quando uma fêmea de flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo, inocula juntamente com sua saliva formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado. Uma vez que a infecção depende da participação do vetor e do parasita, a resposta imune montada pelo hospedeiro está associada a fatores relacionados com o vetor, com o parasita, além daqueles relacionados a fatores genéticos e ao próprio estado imunológico do hospedeiro vertebrado.

1.1.1 – Resposta imune a *Leishmania major*: um modelo para o estudo da imunidade nas infecções por *Leishmania*

A infecção por *L. major* tem sido muito utilizada como modelo para estudar os eventos da resposta imune a *Leishmania* associados com a cura das lesões, como visto no modelo de resistência, e aqueles relacionados com a gravidade da doença nos animais susceptíveis. Tais estudos permitiram a caracterização das respostas de células T auxiliares (Th), estando a polarização para uma resposta de células T auxiliares do tipo 1 (Th1) associada à resistência a infecção por *L. major*, enquanto que a polarização para Th2 está relacionada com a susceptibilidade a tais infecções (Heinzel *et al.*, 1989; Lohoff *et al.*, 1998).

No modelo de resistência à infecção, o desenvolvimento e a manutenção de uma resposta Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ , requer a produção de IL-12 (Park *et al.*, 2000; Scharon-Kersten *et al.*, 1995; Scharon-Kersten & Scott, 1995). Nas infecções por *L. major*, as células dendríticas compõem a principal fonte de IL-12 (Scott & Hunter, 2002). A produção de IL-12 no início da infecção também tem um papel muito significativo na ativação de células NK, que são importantes células da imunidade inata produtoras de IFN- γ . Por meio da produção de IFN- γ , as células NK participam tanto da iniciação da diferenciação de células Th1, quanto do controle inicial da multiplicação do parasita, anterior ao estabelecimento de respostas adaptativas (Scharon & Scott, 1993; Laskay *et al.*, 1995). Assim, as células NK são importantes na resistência à infecção por *L. major* (Scharon & Scott, 1993).

O IFN- γ é uma citocina tipicamente produzida nas respostas Th1 e é essencial para a resistência a *L. major*. Camundongos de uma linhagem resistente a *L. major* ao serem tratados com anticorpo anti-IFN- γ tornam-se susceptíveis à infecção (Belosevic *et al.*, 1989). De maneira semelhante, camundongos de fundo genético resistente à infecção que não expressam o receptor de IFN- γ também se tornam susceptíveis à infecção por *L. major* (Swihart *et al.*, 1995). IFN- γ atua sobre macrófagos ativando uma série de mecanismos microbicidas, que incluem a produção de superóxidos e óxido nítrico (Green *et al.*, 1990b). No caso específico da infecção por *L. major*, porém, o mecanismo efetor utilizado por macrófagos para eliminar o parasita é via produção de óxido nítrico (Green *et al.*, 1990b; Liew *et al.*, 1990).

No modelo de susceptibilidade à infecção por *L. major*, há o desenvolvimento de uma resposta Th2, caracterizada pela produção de IL-4. A própria diferenciação de células Th0 em células Th2 requer a presença de IL-4 (Chatelain *et al.*, 1992). Além disso, há uma relação direta entre a produção de IL-4 e o desenvolvimento da doença em camundongos infectados por *L. major*, uma vez que a expressão de altos níveis de IL-4 em camundongos de uma linhagem resistente à infecção os torna susceptíveis (Leal *et al.*, 1993). No entanto, outros trabalhos sugerem que a susceptibilidade à infecção por *L. major* está mais relacionada a uma inabilidade em gerar uma resposta Th1 do que a uma resposta Th2 persistente induzida por IL-4 (Guler *et al.*, 1996; Kropf *et al.*, 1997). Além disso, outros fatores estão associados à susceptibilidade à infecção por *L. major*. É interessante notar que nos animais susceptíveis a *L. major* há uma regulação negativa da expressão do receptor de IL-12 em células CD4⁺, CD8⁺ e B220⁺, havendo, portanto, uma menor capacidade de responder a IL-12 nos linfonodos destes animais (Jones *et al.*, 1998). Ainda mais notável é o fato de que IL-4 inibe

não só a síntese de IL-12 por células dendríticas como também a expressão do receptor da IL-12 (Jones *et al.*, 1998; Macatonia *et al.*, 1995).

IL-13 é outro fator que parece estar relacionado com a susceptibilidade à infecção por *L. major*. Foi demonstrado que animais deficientes em IL-13 são resistentes à infecção e que a deleção concomitante de IL-4 e IL-13 tem efeito aditivo, tornando os animais ainda mais resistentes à infecção do que aqueles que apresentam a deleção isolada de cada um dos genes (Matthews *et al.*, 2000).

Outro fator recentemente associado à susceptibilidade de camundongos BALB/c frente a *L. major* é a citocina IL-17. IL-17 é um mediador químico altamente pró-inflamatório que mostrou ser patogênico em camundongos BALB/c por regular positivamente o recrutamento de neutrófilos para o local da lesão, o que contribui para a exacerbação da doença (Lopez Kostka *et al.*, 2009).

A enzima arginase contribui para a susceptibilidade à infecção por *L. major*. A arginase sintetiza, a partir de L-arginina, L-ornitina, que é utilizada por *L. major* para a produção de poliaminas, que favorecem o desenvolvimento do parasita no interior dos macrófagos (Iniesta *et al.*, 2005). A expressão de arginase é especificamente induzida por IL-4 e IL-10, citocinas produzidas durante respostas Th2 (Iniesta *et al.*, 2002). Arginase e iNOS são enzimas envolvidas no metabolismo de L-arginina nos macrófagos que têm efeitos opostos. Enquanto a expressão de arginase é induzida por IL-4 e IL-10 e favorece a replicação do parasita e, portanto, a susceptibilidade à infecção por *L. major*, a expressão de iNOS é disparada por IFN- γ e favorece a eliminação do parasita e assim a resistência à infecção (Corraliza *et al.*, 1995). Ademais, a alta atividade de arginase na lesão causa uma depleção local de L-arginina, impedindo a capacidade de proliferação de células T e produção de IFN- γ . Tal mecanismo, portanto, compromete as funções de células T no local da infecção, sem afetar a resposta imune desenvolvida nos linfonodos (Modolell *et al.*, 2009).

1.1.2 – Resposta imune a *Leishmania amazonensis*

Apesar de a dicotomia Th1/Th2 ser bem estabelecida no modelo de infecção por *L. major*, a mesma não é adequada para explicar a patogênese da infecção murina por *L. amazonensis*. Linhagens de camundongos geneticamente resistentes a *L. major*, como C3H, C57BL/6, C57BL/10, são susceptíveis a *L. amazonensis* (Afonso & Scott, 1993; Ji *et al.*,

2003; Jones *et al.*, 2000). Há evidências crescentes de que a susceptibilidade a *L. amazonensis* é resultado da montagem de uma resposta imune distinta daquela observada nas infecções por *L. major*.

Um conjunto de evidências revela que nas infecções por *L. amazonensis* há uma falha na apresentação de antígenos e subsequente estimulação de células T CD4⁺ (Favali *et al.*, 2007; Prina *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2001; Vanloubbeeck *et al.*, 2004; Xin *et al.*, 2008). A infecção com *L. amazonensis* ativa a via de sinalização PI3K que suprime a produção de IL-12 por células dendríticas (Ruhland & Kima, 2009), que representam a principal fonte de IL-12 durante a infecção por *L. major*. Assim, células dendríticas infectadas com *L. amazonensis* apresentam uma eficiência reduzida na estimulação de células T CD4⁺ e, conseqüentemente, na ativação de respostas Th1.

O envolvimento de células T CD4⁺ nas infecções por *L. amazonensis* já foi extensamente estudado, porém os mecanismos envolvidos na susceptibilidade de camundongos geneticamente resistentes a *L. major* ainda não foram completamente esclarecidos. Há indícios de que ocorre uma falha durante a transição de células T ativadas para células T efetoras, visto que camundongos infectados com *L. amazonensis* apresentam alta frequência de células T com o fenótipo efector/memória CD4⁺ CD44^{alto} produtoras de IL-2 e que proliferam em resposta a estimulação antigênica, porém sem comprometimento com um fenótipo Th1 ou Th2 (Ramer *et al.*, 2006). Uma série de trabalhos indica que a susceptibilidade a *L. amazonensis* por camundongos resistentes a *L. major* está relacionada mais ao desenvolvimento de uma resposta mista Th1/Th2, ou a uma ausência de resposta Th1 eficiente, do que à presença de resposta Th2 (Afonso & Scott, 1993; Ji *et al.*, 2002). Camundongos C3H infectados com *L. amazonensis* apresentam um defeito específico na expressão da subunidade β2 do receptor da IL-12 por células T CD4⁺, que não é revertido pela administração exógena de IL-12, e que é independente de IL-4 (Jones *et al.*, 2000). Por outro lado, IL-10 parece ter um papel importante na modulação negativa da resposta Th1 após a infecção por *L. amazonensis*, porém outros fatores parecem estar envolvidos na limitação de respostas Th1 na fase crônica da infecção (Jones *et al.*, 2002).

Ao contrário, a resposta de camundongos BALB/c, que são susceptíveis tanto a *L. major* quanto a *L. amazonensis*, é caracterizada pelo desenvolvimento de uma resposta Th2, com produção de altos níveis de IL-4 (Afonso & Scott, 1993; Guimaraes *et al.*, 2006). Além disso, a produção de IL-10 também está envolvida na susceptibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. amazonensis*, regulando negativamente o desenvolvimento de respostas protetoras do tipo Th1 (Padigel *et al.*, 2003).

Apesar de haver uma deficiência na ativação de uma resposta eficiente de células T na infecção por *L. amazonensis*, o estudo das infecções pelo dado parasita em camundongos deficientes em resposta de células T demonstrou que células T CD4⁺ têm um papel primordial na mediação da patogênese das lesões por *L. amazonensis* (Soong *et al.*, 1997; Terabe *et al.*, 1999a; Terabe *et al.*, 1999b). Camundongos *nudes*, RAG2^{-/-} e MHCII^{-/-} não desenvolvem lesão em resposta à infecção por *L. amazonensis* (Soong *et al.*, 1997). Contudo, apesar de não haver desenvolvimento da lesão, não ocorre eliminação do parasita, sendo possível encontrar parasitas extracelulares ou no interior de histiócitos. O que ocorre de fato é uma redução da produção de citocinas e do número de células T CD8⁺, monócitos/macrófagos e neutrófilos no sítio de infecção. Dessa forma, é provável que células T CD4⁺ mediem o recrutamento de células e, conseqüentemente, a formação do infiltrado inflamatório no sítio de infecção, a patologia das lesões e, portanto, a susceptibilidade a *L. amazonensis* (Soong *et al.*, 1997; Terabe *et al.*, 1999a; Terabe *et al.*, 1999b).

Células T regulatórias exercem um controle sobre as respostas de células T, tanto sobre as respostas Th1 quanto sobre as Th2. No caso das infecções por *L. amazonensis*, a expansão de células T regulatórias tem um efeito benéfico transitório, que correlaciona com a ativação diminuída de células T produtoras de IFN- γ (Ji *et al.*, 2005). Logo, células T regulatórias atuam na retenção de respostas patogênicas de células T durante as infecções por *L. amazonensis*.

Apesar de células B e anticorpos estarem relacionados com a eliminação do parasita via ativação de macrófagos e produção de superóxido (Mukbel *et al.*, 2006), os mesmos também parecem estar envolvidos na patogênese da doença em camundongos infectados por *L. amazonensis* (Wanasen *et al.*, 2008). O estudo com camundongos deficientes em linfócitos B e anticorpos mostrou que tais animais apresentam um atraso no estabelecimento da doença, desenvolvem lesões menores, que apresentam menor frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ quando comparada aos animais tipo selvagem (Wanasen *et al.*, 2008). Portanto, é possível que a participação de células B e anticorpos na patogênese das lesões por *L. amazonensis* ocorra devido ao envolvimento de tais células na estimulação de células T antígeno-específicas. Além disso, a opsonização do parasita com anticorpos favorece a maturação de células dendríticas, estimulando as mesmas a produzirem níveis mais elevados de citocinas, e, assim, aumentando a habilidade destas células em estimular células T CD4⁺ (Prina *et al.*, 2004).

Vimos anteriormente que nas infecções por *L. major* IFN- γ tem um papel essencial no controle da replicação do parasita e, por conseguinte, na progressão da lesão (Deng *et al.*, 1993; Green *et al.*, 1990a; Green *et al.*, 1990b). Entretanto, surpreendentemente nas infecções

por *L. amazonensis*, IFN- γ pode promover a proliferação de amastigotas de *L. amazonensis* no interior do macrófago, dependendo da concentração e dos estímulos aos quais estiver associado (QI *et al.*, 2004). A replicação do parasita induzida por IFN- γ parece estar associada ao transporte de L-arginina por meio do transportador 2B de aminoácidos catiônicos. A L-arginina, por sua vez, medeia a replicação do parasita por vários mecanismos, incluindo aqueles dependentes de arginase (via estimulação com IL-4) e os independentes de arginase (via estimulação por IFN- γ) (Wanasen *et al.*, 2007).

Ao contrário do que é observado nas infecções por *L. major*, a eliminação eficiente de amastigotas de *L. amazonensis* requer não só a produção de óxido nítrico, mas também a presença de superóxido (Mukbel *et al.*, 2007). Ademais, amastigotas de *L. amazonensis* são muito mais resistentes à morte mediada por NO do que amastigotas de *L. major*, visto que níveis muito maiores de NO são requeridos para eliminação eficiente de *L. amazonensis* (Gomes *et al.*, 2003; Mukbel *et al.*, 2007; Wanasen *et al.*, 2007). Além disso, o parasita tem a capacidade de modular negativamente a produção de NO por mecanismos independentes da produção de IL-4, IL-10 ou TGF- β (Balestieri *et al.*, 2002). A infecção com promastigotas de *L. amazonensis* ativa o complexo repressor de NF- κ B em macrófagos, regulando negativamente a expressão de iNOS, o que favorece o estabelecimento e sucesso da infecção por *L. amazonensis* (Calegari-Silva *et al.*, 2009).

1.2 – Papel da citocina IL-10 na resposta a *Leishmania*

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, inicialmente descrita como uma citocina produzida por células Th2 que inibe a síntese de citocinas produzidas por células Th1. No entanto, hoje sabemos que vários tipos celulares incluindo macrófagos, células dendríticas, células B, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ são capazes de produzir IL-10. IL-10 atua tanto sobre células da imunidade inata, como células NK e macrófagos, quanto sobre células da imunidade adquirida, como células Th1, inibindo suas atividades. IL-10 atua diretamente sobre macrófagos inibindo a expressão de MHC de classe II e de moléculas co-estimulatórias, como B7-1/B7-2, e limitando a produção de citocinas inflamatórias. IL-10 também pode agir diretamente sobre células T CD4⁺, inibindo sua proliferação e a produção de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-5 e TNF- α (revisado em (Couper *et al.*, 2008)).

IL-10 está envolvida na susceptibilidade às infecções por *Leishmania*. Na infecção por *L. major*, IL-10 contribui para a susceptibilidade de camundongos BALB/c. Camundongos deficientes em IL-10 controlam a progressão da doença, apresentando menores lesões com menos parasitas (Kane & Mosser, 2001). Neste trabalho os autores sugerem que a IL-10 atua na prevenção da ativação de macrófagos, diminuindo a sua produção de IL-12 e TNF- α . Apesar de outros fatores estarem envolvidos na susceptibilidade de camundongos BALB/c, IL-10 se mostrou ser tão importante na indução da susceptibilidade a *L. major* quanto IL-4 e IL-13, mesmo em cepas de *L. major* que são relativamente resistentes a IFN- γ (Noben-Trauth *et al.*, 2003). A internalização de parasitas opsonizados via Fc γ R representa um potente estímulo para a produção de IL-10 por macrófagos durante as infecções por *Leishmania* (Miles *et al.*, 2005; Padigel & Farrell, 2005). Além disso, já foi demonstrado que a citocina IL-10 produzida por células B regulatórias em resposta à infecção por *L. amazonensis* contribui para o desenvolvimento de resposta Th2 em camundongos BALB/c (Ronet *et al.*, 2010). IL-10 também desempenha um importante papel em camundongos resistentes a *L. major*. Em camundongos C57BL/6, IL-10 contribui para a persistência do parasita após a cura, resultando na manutenção de reservatórios do parasita e em risco de reativação da doença no hospedeiro (Belkaid *et al.*, 2001). Células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ produtoras de IL-10 tem um importante papel nesta persistência do parasita devido à sua capacidade de suprimir a habilidade de células T efetoras CD4⁺CD25⁻ de eliminar os parasitas. Na ausência de IL-10 a cura estéril é atingida, no entanto isto implica na perda da imunidade à reinfeção (Belkaid *et al.*, 2002).

IL-10 também está envolvida na susceptibilidade a outras espécies de *Leishmania*. IL-10 é um componente chave na prevenção da resistência a *L. donovani*. Camundongos BALB/c e C57BL/6 deficientes em IL-10 são altamente resistentes à infecção por *L. donovani* (Murphy *et al.*, 2001). Na ausência de IL-10, a resistência à infecção foi associada com um desenvolvimento acelerado de granulomas, rápida eliminação do parasita e níveis elevados de IL-12, IFN- γ e NO (Murray *et al.*, 2002). Além disso, a produção de IL-10 correlaciona-se com a patologia em infecções por *L. donovani* em humanos (Ghalib *et al.*, 1993). Em indivíduos infectados com *L. braziliensis* também foi encontrada uma forte correlação entre a produção de IL-10 e o desenvolvimento de lesões (Salhi *et al.*, 2008). IL-10 é um importante fator de susceptibilidade na infecção por *L. mexicana* em camundongos C57BL/6, uma vez que inibe a produção de IL-12, IFN- γ e NO, favorecendo a proliferação do parasita e o desenvolvimento de lesões (Buxbaum & Scott, 2005a). Por outro lado, na infecção de

camundongos BALB/c por *L. mexicana*, IL-10 não tem um papel dominante como mediador da susceptibilidade. Camundongos BALB/c deficientes em IL-10 apresentam produção aumentada de IFN- γ e NO e maior expressão de IL-12 e IL-12R β_2 , indicando que IL-10 regula o desenvolvimento de respostas Th1 nestes animais. O controle das respostas Th1 parece ser essencial para a proliferação do parasita, no entanto não é suficiente para controlar a progressão das lesões. A eficiente resolução das lesões em camundongos BALB/c requer o bloqueio concomitante de IL-10 e IL-4 (Padigel *et al.*, 2003).

Finalmente, na infecção por *L. amazonensis* também foi demonstrado que amastigotas opsonizadas ativam ERK1/2 via sinalização por receptores Fc γ , o que resulta na produção de altos níveis de IL-10 por macrófagos, que contribui para a susceptibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. amazonensis* (Yang *et al.*, 2007). Em camundongos C57BL/6, a deficiência em IL-10 resulta em resposta Th1 aumentada e carga de parasitas reduzida, porém o curso de infecção permanece inalterado (Jones *et al.*, 2002). Portanto IL-10 limita as respostas Th1 na fase aguda da infecção, porém outros fatores estão envolvidos na susceptibilidade destes camundongos a *L. amazonensis*.

1.3 – Neutrófilos

1.3.1 – Funções na imunidade inata

Neutrófilos representam a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos e são componentes essenciais das respostas inflamatórias agudas, participando ativamente da resolução de infecções microbianas. Em resposta à entrada de um microrganismo invasor ou ao dano tecidual, são produzidos vários mediadores químicos envolvidos no recrutamento de neutrófilos para o tecido inflamado, entre eles o fragmento C5a do complemento; leucotrieno B4 (LTB4); fator de agregação plaquetária (PAF); as quimiocinas CXCL1/KC, CXCL-2/MIP-2 e CXCL-8/IL-8; e as citocinas TNF- α e IL-1. Neutrófilos não ativados apresentam um repertório restrito de receptores de superfície, porém em resposta ao dano tecidual ou a um patógeno, o endotélio ativado passa a expressar P-selectina que é reconhecida pela L-selectina na superfície dos neutrófilos. A interação entre tais moléculas favorece o rolamento dos neutrófilos e a fusão de vesículas secretórias, dotadas de vários receptores de superfície,

com a membrana plasmática do neutrófilo (Borregaard *et al.*, 1994). Assim, os neutrófilos tornam-se capazes de responder eficientemente aos estímulos provenientes do sítio de infecção ou injúria.

No sítio de infecção, os neutrófilos podem atuar na eliminação de microrganismos invasores por meio de uma série de mecanismos. O principal deles é a fagocitose do patógeno, o qual fica confinado no fagossomo que, em seguida, se funde com os grânulos intracelulares dos neutrófilos, formando, então, o fagolisossomo. No fagolisossomo os patógenos são eliminados pela ação de enzimas, peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (Borregaard *et al.*, 2007). Espécies reativas de oxigênio se originam a partir da redução de oxigênio não mitocondrial durante a explosão respiratória. Tais produtos têm efeitos extremamente danosos tanto para os patógenos como para o próprio organismo invadido, pois apresentam alta reatividade e baixa especificidade, sendo capazes de interagir com um número praticamente ilimitado de moléculas (Nathan, 2006).

Como vimos, após a fagocitose do micróbio, o conteúdo dos grânulos dos neutrófilos é fornecido ao fagossomo, de forma que peptídeos microbianos e enzimas podem atuar diretamente sobre o parasita, promovendo a eliminação do mesmo. No entanto, quando os neutrófilos não conseguem englobar os microrganismos invasores, eles liberam o conteúdo de seus grânulos para o meio extracelular. As MMPs desorganizam a matriz extracelular, que impede o contato entre o neutrófilo e o patógeno, enquanto os peptídeos antimicrobianos, lisozima e proteases se difundem pelo tecido liquefeito para atingir os micróbios e eliminá-los. Ao mesmo tempo, a desorganização do tecido contribui para colapsar vasos linfáticos e capilares, impedindo que os microrganismos escapem por tais rotas (Nathan, 2006).

Outro mecanismo utilizado por neutrófilos para a eliminação de micróbios é a formação de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*), que são verdadeiras armadilhas produzidas por neutrófilos no espaço extracelular. NETs são formadas por um arcabouço de cromatina, ao qual se encontram associados peptídeos e enzimas, que normalmente se localizam nos grânulos dos neutrófilos (Brinkmann *et al.*, 2004; Wartha *et al.*, 2007). Assim, NETs representam um mecanismo eficiente que evita a disseminação do patógeno e favorece a concentração local de diversos agentes antimicrobianos, que atuam na degradação de fatores de virulência e até mesmo na eliminação do micróbio invasor (Brinkmann *et al.*, 2004).

Após toda a destruição causada durante o processo inflamatório, os neutrófilos participam também do processo de regeneração do tecido. Para tal, os neutrófilos começam a gerar sinais com quatro propósitos principais: retardar seu próprio acúmulo no tecido inflamado; suprimir suas próprias atividades; promover sua própria morte; e atrair e ativar

macrófagos a cessar o dano ao tecido e iniciar a orquestração do reparo tecidual (Nathan, 2006).

1.3.2 – Funções na imunidade adquirida

Além do reconhecido papel dos neutrófilos na imunidade inata, tais células também têm uma função imunomodulatória relevante, participando no desenvolvimento da resposta imune adquirida (Appelberg, 2007). Uma das formas pela qual neutrófilos influenciam a imunidade adaptativa é via produção de grande variedade de quimiocinas e citocinas (Bennouna *et al.*, 2003; Bliss *et al.*, 2000; Bliss *et al.*, 1999; Charmoy *et al.*, 2007; de Oca *et al.*, 2000; Scapini *et al.*, 2000; van Gisbergen *et al.*, 2005b). Embora neutrófilos individuais produzam menos moléculas de uma dada citocina do que macrófagos e linfócitos, o número de neutrófilos no sítio inflamado geralmente excede o número de leucócitos mononucleados em uma ou duas ordens de magnitude (Nathan, 2006). Assim, neutrófilos podem ser considerados fontes importantes de quimiocinas e citocinas, atuando, portanto, na orquestração do recrutamento sequencial de diferentes tipos de leucócitos para o tecido inflamado. Já foi demonstrado o importante papel dos neutrófilos na indução da migração de macrófagos, bem como na conversão de macrófagos residentes em macrófagos classicamente ativados, os quais são células efetoras que controlam as infecções por *Leishmania* e *Toxoplasma* (Liew *et al.*, 1999; Sher *et al.*, 2003; Soehnlein *et al.*, 2008; Takeuchi *et al.*, 2008).

Contribuição ainda maior para o desenvolvimento da imunidade adquirida é dada pela interação entre neutrófilos e células dendríticas. Primeiramente, neutrófilos atraem células dendríticas imaturas para o sítio inflamado pela produção das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β e CCL5/RANTES, as quais têm efeito quimiotático sobre células dendríticas (Bennouna *et al.*, 2003). Neutrófilos e células dendríticas interagem intimamente via DC-Sign na superfície das células dendríticas e Mac-1 na superfície dos neutrófilos, de modo que o TNF- α , produzido por neutrófilos, atua diretamente sobre as células dendríticas, induzindo a maturação destas (Bennouna *et al.*, 2003; Megiovanni *et al.*, 2006; van Gisbergen *et al.*, 2005a; van Gisbergen *et al.*, 2005b). Células dendríticas ativadas por neutrófilos disparam a proliferação de células T e instruem a polarização destas para uma população de células Th1 (van Gisbergen *et al.*, 2005a). Além disso, há indícios de que neutrófilos sejam capazes de

transferir antígenos diretamente para as células dendríticas por um mecanismo dependente de contato (Megiovanni *et al.*, 2006).

Recentemente, alguns trabalhos têm demonstrado que os neutrófilos são capazes de migrar para os linfonodos, podendo atuar no transporte de antígenos para os órgãos linfóides secundários, via vasos linfáticos aferentes (Abadie *et al.*, 2005; Bonneau *et al.*, 2006; Maletto *et al.*, 2006). Além disso, foi sugerida a possibilidade de que os próprios neutrófilos possam instruir a polarização Th1, visto que são células produtoras de IL-12 (citocina indutora da diferenciação Th1) com capacidade de migrar para os linfonodos (Abadie *et al.*, 2005; Bliss *et al.*, 2000; van Gisbergen *et al.*, 2005b).

1.3.3 – Participação dos neutrófilos nas infecções por *Leishmania*

Embora neutrófilos sejam células importantes do sistema imune, com capacidade de eliminar patógenos e iniciar uma resposta imune adaptativa, ainda não está claro qual é o papel dos neutrófilos na resposta imune às infecções por *Leishmania*. Só recentemente foram dedicados mais esforços no sentido de desvendar o envolvimento de neutrófilos nas infecções por *Leishmania*. Estudos *in vitro* demonstraram que promastigotas de várias espécies de *Leishmania* apresentam efeito quimiotático específico sobre neutrófilos humanos, mas não sobre outras células do sistema imune, como macrófagos e células NK (van Zandbergen *et al.*, 2002). Este efeito de atração de neutrófilos é amplificado pela produção de IL-8 pelos próprios neutrófilos que migram para o local. Por outro lado, o parasita inibe a produção de CXCL10/IP-10, o que previne a migração e ativação de células NK (van Zandbergen *et al.*, 2002). Assim, em resposta a estímulos produzidos pelo próprio parasita, os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio de infecção, onde são capazes de fagocitar promastigotas de *Leishmania* por mecanismos dependentes ou independentes de opsoninas e complemento (Gueirard *et al.*, 2008; Laufs *et al.*, 2002). No entanto, a fagocitose realizada na ausência de opsoninas favorece a sobrevivência do parasita. Ao contrário, durante a fagocitose dependente de opsoninas, neutrófilos são ativados e podem eliminar eficientemente o parasita (Laufs *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que após a fagocitose o parasita pode ser confinado em dois tipos de compartimento: em um deles, o fagossomo se funde aos lisossomos e o parasita é rapidamente degradado; no outro, não há fusão com lisossomos, de modo que o compartimento tem características de retículo endoplasmático, e nele os parasitas

ficam protegidos da degradação (Gueirard *et al.*, 2008). LPG, um lipofosfoglicano presente na membrana plasmática do parasita, parece ser requerido para a inibição da fusão com o lisossomo (Gueirard *et al.*, 2008). Outro dado interessante é que a fagocitose do parasita retarda a apoptose de neutrófilos por um mecanismo relacionado com uma redução significativa da atividade de caspase-3 (Aga *et al.*, 2002). Deste modo, com base nestes resultados *in vitro* foi levantada a hipótese de que uma vez que os neutrófilos fagocitam o parasita, e este pode permanecer viável dentro de neutrófilos e induzir atraso na apoptose de polimorfonucleares, os neutrófilos poderiam, portanto, atuar como células hospedeiras para a *Leishmania* (Gueirard *et al.*, 2008; Laufs *et al.*, 2002).

Outros experimentos *in vitro* demonstraram que neutrófilos infectados com *L. major* secretam altos níveis de CCL4, que tem efeito quimiotático sobre macrófagos, os quais são capazes de internalizar neutrófilos apoptóticos infectados (van Zandbergen *et al.*, 2004). Os parasitas captados indiretamente são capazes de sobreviver e se multiplicar dentro dos macrófagos. Além disso, a ingestão de neutrófilos apoptóticos resultou na liberação de TGF- β , uma citocina anti-inflamatória (van Zandbergen *et al.*, 2004). Assim, em função destes experimentos realizados *in vitro* foi sugerida a hipótese do cavalo de Troia na qual o parasita utiliza neutrófilos para entrar silenciosamente em macrófagos, células hospedeiras definitivas do parasita (Gueirard *et al.*, 2008; Laskay *et al.*, 2003; Laskay *et al.*, 2008; van Zandbergen *et al.*, 2004). Deste modo, os neutrófilos estariam envolvidos na susceptibilidade à infecção por *Leishmania*.

Estudos da interação entre neutrófilos e macrófagos infectados demonstraram que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos induz um fenótipo regulatório IL-12^{low}IL-10^{high} em macrófagos infectados com *L. major*. Tal fenótipo favorece a replicação do parasita dentro do macrófago assim como o desenvolvimento de resposta de células Th2. Porém este mecanismo foi descrito apenas para a fagocitose de neutrófilos de camundongos C57BL/6 (Filardy *et al.*, 2010). Tais estudos, portanto, dão suporte a hipótese de que neutrófilos estariam envolvidos na susceptibilidade à *L. major*.

Contrariando a hipótese do cavalo de Troia, foi demonstrado que a interação entre CD28 na superfície de neutrófilos e B7 na superfície de macrófagos desencadeia em neutrófilos tanto a produção de IFN- γ , que restringe o crescimento do parasita no interior do macrófago, quanto a liberação de fatores quimiotáticos para células T (Venuprasad *et al.*, 2002; Venuprasad *et al.*, 2003). Assim, visto que neutrófilos são capazes de atrair células T e produzir IFN- γ e que o microambiente de citocinas afeta a diferenciação de células T auxiliares, foi sugerido que o IFN- γ secretado por polimorfonucleares pode ter algum papel na

polarização para Th1 (Venuprasad *et al.*, 2003). Ribeiro-Gomes e colaboradores também mostraram que neutrófilos podem ter um papel na resistência à infecção por *Leishmania*, uma vez que a elastase neutrofílica (NE) produzida por neutrófilos inflamatórios ativa macrófagos, induzindo atividade microbicida dependente da secreção de TNF- α (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007).

O papel dos neutrófilos na infecção *in vivo* por *Leishmania* tem sido estudado principalmente utilizando o modelo murino de leishmaniose cutânea induzida por injeções subcutâneas do parasita *L. major*. Foi sugerido que a interação entre macrófagos e neutrófilos mortos tem uma importante função na resposta imune a *L. major*. Porém, neutrófilos teriam funções contrárias durante a infecção por *L. major* em linhagens susceptíveis e resistentes, de forma que nos camundongos susceptíveis neutrófilos estariam envolvidos no favorecimento da proliferação do parasita via produção de prostaglandina E2 (PGE₂) e TGF- β , enquanto que nos camundongos resistentes, estariam relacionados com a eliminação do parasita dependente de NE e TNF- α (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Dessa forma neutrófilos teriam um papel permissivo à replicação do parasita no hospedeiro susceptível, e protetor, no hospedeiro resistente. Estudos *in vitro* da resposta de neutrófilos à estimulação com *L. major* corroboram os dados acima apresentados, visto que, em resposta à infecção por *Leishmania*, neutrófilos de camundongos resistentes produzem IL-12p70, a forma bioativa da IL-12, que atua na ativação de células NK e na diferenciação das células Th1. Por outro lado, a interação com *L. major* induz a produção de grandes quantidades de IL-12p40 por neutrófilos de camundongos susceptíveis. Homodímeros de IL-12p40 se ligam ao receptor da IL-12, bloqueando a sinalização por tal citocina (Charmoy *et al.*, 2007). A participação de neutrófilos no bloqueio da sinalização por IL-12 pode explicar, pelo menos parcialmente, o fato de que a depleção de neutrófilos resulta em uma menor expressão de IL-4 e diferenciação Th2, e conseqüentemente no desenvolvimento de lesões menores (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Assim, o papel de neutrófilos na susceptibilidade à infecção por *L. major* em camundongos BALB/c parece estar relacionado com a função imunomoduladora destas células. Por outro lado, Peters e colaboradores demonstraram que neutrófilos não são capazes de eliminar eficientemente o parasita, sendo possível que neutrófilos facilitem a infecção por salvar parasitas não acessíveis a outros fagócitos da morte no meio extracelular. Além disso, este estudo demonstrou que neutrófilos apoptóticos sofrem lise, liberando parasitas viáveis que são subsequentemente internalizados por outros fagócitos, incluindo macrófagos (Peters *et al.*, 2008). Assim, apesar de sugerir que neutrófilos favorecem a sobrevivência do parasita no hospedeiro, o possível mecanismo envolvido contraria a hipótese do cavalo de troia.

De maneira oposta, alguns estudos *in vivo* apontam para um papel protetor de neutrófilos na infecção de camundongos susceptíveis a *L. major* (Chen *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 1998). Nestes ensaios, a depleção de neutrófilos resultou em exacerbação da lesão e da carga parasitária, associada a um aumento na expressão de IL-4 nos linfonodos drenantes da lesão (Chen *et al.*, 2005). Dessa forma, estes trabalhos sugerem que neutrófilos seriam necessários para conferir certa resistência a *L. major*, no camundongo BALB/c.

No que se refere ao papel de neutrófilos na infecção por *L. major* em camundongos resistentes, tais células parecem ter uma participação na proteção contra a infecção, visto que a depleção de neutrófilos exacerba a lesão e a carga parasitária (Lima *et al.*, 1998; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Neutrófilos mostraram ter um importante papel na iniciação da resposta imune a *L. major*, por atuarem como fonte de MIP-1 α , que é essencial para o recrutamento de células dendríticas para o sítio de inoculação de *L. major* (Charmoy *et al.*, 2010). Porém, em outro trabalho, a depleção de neutrófilos não alterou a produção de IL-12p40 ou de IFN- γ , nem o crescimento do parasita (Chen *et al.*, 2005). Tais resultados contraditórios, tanto no que se refere ao modelo de resistência quanto ao modelo de susceptibilidade, podem ser atribuídos ao uso de diferentes cepas de *L. major*, diferentes locais de infecção, e ao uso de diferentes anticorpos monoclonais e esquemas de tratamentos para a depleção de neutrófilos.

A participação de neutrófilos em infecções por outras espécies de *Leishmania* já foi estudada (McFarlane *et al.*, 2008; Rousseau *et al.*, 2001). Neutrófilos são importantes na eliminação de *L. infantum* no baço durante os estágios iniciais de infecção (Rousseau *et al.*, 2001). Nas infecções por *L. donovani*, neutrófilos parecem ter um papel protetor tanto como células efetoras, envolvidas na morte do parasita, quanto como células imunorregulatórias, que influenciam o desenvolvimento de uma resposta Th1 (McFarlane *et al.*, 2008). Embora os neutrófilos participem da resistência a *L. donovani*, o mecanismo de eliminação do parasita não é via formação de NETs, visto que foi demonstrado que o parasita é capaz de evadir os mecanismos microbicidas das NETs (Gabriel *et al.*, 2010). Neutrófilos também favorecem a imunidade protetora contra *L. braziliensis*. Neste modelo, a depleção de neutrófilos levou a um aumento na carga de parasitas e na resposta imune Th1/Th2. Experimentos *in vitro* mostraram que a coincubação de neutrófilos e macrófagos infectados com *L. braziliensis* resulta em diminuição da carga de parasitas por um mecanismo dependente de TNF- α e superóxido (Novais *et al.*, 2009).

Finalmente, na infecção por *L. amazonensis*, experimentos *in vitro* com células humanas demonstraram que a interação com neutrófilos apoptóticos favorece a replicação do parasita no macrófago por um mecanismo dependente de PGE₂ e TGF- β , enquanto que a

fagocitose de neutrófilos necróticos induz a eliminação do parasita dependente de NE e TNF- α (Afonso *et al.*, 2008). Experimentos em camundongos das linhagens BALB/c e C3H indicam que a interação entre neutrófilos e macrófagos infectados contribui para a eliminação do parasita via produção de TNF- α e PAF (de Souza Carmo *et al.*, 2010).

Assim, vimos que a leishmaniose cutânea é um sério problema de saúde pública no Brasil e que *L. amazonensis* é um dos principais agentes causadores desta enfermidade nas Américas. Além disso, *L. amazonensis* é capaz de produzir um amplo espectro de formas clínicas em humanos, incluindo a leishmaniose cutânea, a leishmaniose cutânea difusa, a leishmaniose mucocutânea e até mesmo a leishmaniose visceral (Barral *et al.*, 1991). Deste modo, faz-se necessário compreender melhor os mecanismos associados à susceptibilidade e à resistência à infecção por *L. amazonensis*. A resposta imune a *Leishmania* tem sido bastante estudada no modelo murino de infecção por *L. major*. No entanto, como vimos estes estudos não refletem bem o que acontece nas infecções por outras espécies de *Leishmania*. A resposta imune montada frente a *L. amazonensis* é muito diferente daquela montada contra *L. major*, tanto no que diz respeito à imunidade inata quanto à imunidade adaptativa. A participação de neutrófilos na resposta imune a *L. amazonensis* foi estudada principalmente em modelos *in vitro* de interação entre neutrófilos e o parasita ou da interação entre neutrófilos e macrófagos infectados. Contudo estes trabalhos não refletem bem o que acontece nos estágios iniciais da infecção natural, uma vez que os neutrófilos chegam ao sítio de infecção antes que os macrófagos e fagocitam o parasita, e só mais tarde os macrófagos atingem o sítio de infecção (Peters *et al.*, 2008). Em função das razões acima descritas, no presente trabalho nosso objetivo principal foi desvendar o papel dos neutrófilos durante o estabelecimento da infecção por *L. amazonensis* em um modelo de infecção *in vivo*.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Parte 1:

- Avaliar o papel dos neutrófilos na infecção por *Leishmania amazonensis*.

Parte 2:

- Avaliar o papel da IL-10 induzida pelo parasita sobre a replicação do mesmo em um modelo de infecção *in vitro*, utilizando macrófagos, que representam as principais células hospedeiras do parasita.

2.2 – Objetivos específicos

Parte 1:

- Determinar a cinética de migração de neutrófilos para o sítio de infecção em resposta a *L. amazonensis* em camundongos BALB/c e C57BL/6.
- Avaliar o efeito da depleção de neutrófilos no estabelecimento da lesão por meio de monitoração da medida da lesão ao longo do curso de infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 durante a infecção por *L. amazonensis*.
- Determinar a influência da depleção de neutrófilos sobre carga de parasitas e a atividade de arginase no local da infecção e nos linfonodos drenantes da lesão.
- Determinar a influência da depleção de neutrófilos sobre a produção de IL-4, IFN- γ , IL-10 e IL-17 por células de linfonodos reestimuladas com antígeno de *L. amazonensis* e sobre a produção das imunoglobulinas IgG2a e IgG1 anti-*L. amazonensis*.
- Determinar a influência da depleção de neutrófilos sobre o acúmulo de células T regulatórias no local da infecção.

- Verificar se os altos níveis de IL-10 observados nos camundongos depletados de neutrófilos estariam favorecendo a sobrevivência ou replicação do parasita, por meio de tratamento *in vivo* utilizando o anticorpo anti-IL-10R.
- Verificar se há participação dos imunocomplexos na indução da produção de IL-10 em camundongos depletados de neutrófilos.

Parte 2:

- Confirmar que a infecção por formas promastigotas de *L. amazonensis* é capaz de modular a produção de citocinas induzida por LPS e ácido hialurônico, induzindo a produção de altos níveis de IL-10 e reprimindo a produção de IL-12.
- Verificar se amastigotas de *L. amazonensis* também são capazes de induzir a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS.
- Verificar se outras espécies de *Leishmania* também são capazes de induzir a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS.
- Verificar se a produção endógena de IL-10 induzida pela infecção com promastigotas de *L. amazonensis* tem efeito sobre a sobrevivência ou replicação do parasita no interior de macrófagos ativados ou não com IFN- γ .
- Avaliar se a produção de IL-10 induzida pelo parasita controla os níveis de TNF- α e IL-12 e a expressão de iNOS.
- Verificar se existe uma relação entre a proliferação do parasita observada nos macrófagos estimulados com LPS e a atividade das enzimas arginase e iNOS.
- Averiguar se a via de sinalização das MAP/ERK quinases está envolvida na produção de IL-10 induzida pelo parasita.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Camundongos BALB/c e C57BL/6 fêmeas foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO/UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil) e mantidos no biotério experimental do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais passaram por dois ciclos de vermifugação, nos quais os animais foram submetidos a banhos de amitraz (TRIATOX[®] Coopers Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) diluída 1:250 e receberam ricobendazol (Ouro Fino, Ribeirão Preto, SP, Brasil) diluído 1:200 por via oral no primeiro dia e no sétimo dia após a entrada no biotério experimental. Os animais experimentais foram mantidos com barreiras ambientais sob condições de temperatura e fotoperíodo controladas e foram oferecidas ração convencional para camundongos (Labina, Purina, Paulínea, SP, Brasil) e água filtrada *ad libitum*. Foram utilizados cinco a sete camundongos por grupo, com seis a oito semanas de idade ao início de cada experimento. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG. Este projeto foi aprovado pelo CETEA, protocolo nº 051/09.

3.2 – Parasitos

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em *Grace's Insect Medium* (Gibco[®] Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (SBF) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 100 U de penicilina por mL e 100 µg de estreptomicina por mL (Gibco[®] Life Technologies), doravante chamado de meio de Grace completo. Promastigotas de *Leishmania major* (WHO MHOM/IL/80/Friedlin) foram cultivadas em meio Schneider/199 (ambos da GIBCO Life Technologies) suplementado com 10% de SBF (Cultilab), 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co.), 100 U de penicilina por mL e 100 µg de estreptomicina por mL (Gibco[®] Life Technologies).

Promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) também foram cultivadas em meio Schneider/199 porém este foi suplementado com 20% de SBF. As culturas foram mantidas em estufa BOD a 25°C, e repicadas a cada dois ou três dias, até no máximo 10 repiques. Após a décima passagem, os parasitos foram novamente isolados das patas de camundongos BALB/c infectados. Para o isolamento dos parasitas, os animais foram anestesiados com 100 µL de solução anestésica contendo cloridrato de quetamina (Vertbrands, Jacaré, SP, Brasil) a 15 mg/mL e cloridrato de xilazina (Vertbrands) a 5 mg/mL, e tiveram suas patas higienizadas com álcool. Em seguida, com o auxílio de uma seringa contendo uma agulha de calibre 26 G½, as patas foram puncionadas, e o conteúdo da seringa foi transferido para o primeiro poço de uma placa de 96 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) contendo 200 µL de meio Grace completo. Posteriormente, foi realizada diluição seriada da amostra colhida. A placa foi, então, selada e mantida em estufa BOD a 25°C. Após 4 a 7 dias, formas promastigotas de *Leishmania* foram recuperadas da placa e mantidas em garrafas de cultura de 25 cm³ (TPP).

As promastigotas metacíclicas foram obtidas por separação de parasitos em fase estacionária de crescimento (4-6 dias de cultura, dependendo da espécie de *Leishmania*) através de gradiente de densidade como descrito anteriormente (Spath & Beverley, 2001). Em síntese, as culturas de *Leishmania* em fase estacionária foram centrifugadas a 2.000 x g a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e o sedimento recuperado em 2 mL de salina tamponada com fosfato 10 mM, pH 7,3 (PBS), e transferido para um tubo contendo gradiente de Ficoll (Ficoll[®] 400, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, EUA), o qual é composto por uma fase de Ficoll 20% e uma fase de Ficoll 10%. Este material foi centrifugado a 1.250 x g por 10 minutos a 4°C, e a fase contendo as formas metacíclicas foi coletada e lavada três vezes com PBS antes de ser usada para a infecção.

Para gerar amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, culturas ricas em formas promastigotas metacíclicas foram incubadas em meio 199 (Gibco[®] Life Technologies) suplementado com 20% de SBF, 0,25% de glucose, 0,5% de tripticase, 40 mM de succinato de sódio (pH 4,5), 100 U de penicilina por mL e 100 µg de estreptomicina por mL (Gibco[®] Life Technologies) a 32°C por no mínimo 6 dias. As amastigotas axênicas foram mantidas a 32°C.

3.3 – Preparo de antígeno de *Leishmania*

O antígeno particulado de *Leishmania* para estímulo de culturas de linfócitos e para sensibilização da placa de ELISA para dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a no soro foi obtido a partir de culturas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento. As promastigotas foram lavadas em PBS estéril três vezes. O sedimento foi diluído em PBS estéril e o antígeno foi obtido após uma sequência de sete ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. A dosagem de proteínas que compõem o extrato antigênico foi realizada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) e a concentração foi ajustada para 1 mg de proteína por mL de suspensão. O antígeno de *Leishmania* foi estocado em alíquotas de 1 mL, congelado a -20°C e descongelado no momento do uso.

3.4 – Infecção por *Leishmania in vivo*

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados por via intradérmica na orelha com 1×10^6 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* em um volume total de 10 µL, utilizando seringa de vidro de alta precisão (Hamilton, Reno, NV, EUA). Em um conjunto de experimentos o desenvolvimento da lesão foi acompanhado semanalmente, pela medição da espessura das orelhas com um paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda, Itu, SP, Brasil). Posteriormente, outro conjunto de experimentos foi realizado a fim de detalhar o momento inicial de desenvolvimento das lesões e neste caso a medida da espessura das orelhas foi realizada diariamente por uma semana.

3.5 – Tratamento com anticorpos *in vivo*

Para a depleção de neutrófilos, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: RB6-8C5, uma IgG2b de rato que se liga a Ly6G/Ly6C, e 1A8, uma IgG2a de rato que se liga especificamente a Ly6G (Conlan & North, 1994; Peters *et al.*, 2008; Soehnlein *et al.*, 2008).

O hibridoma que secreta RB6-8C5 (RB6) foi gentilmente cedido pela Dra. Glória Maria Collet de Araújo Lima (Universidade Federal de Goiás). O cultivo do hibridoma foi realizado em meio RPMI (Gibco® Life Technologies) suplementado com 10% de SBF (Cultilab), 24 mM de NaHCO₃, 10 mM de HEPES (Sigma Chemical Co.), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co.), 50 µM de β-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.), 50 U de penicilina por mL e 50 µg de estreptomicina por mL (Gibco® Life Technologies), doravante chamado de meio RPMI completo. As células foram mantidas em estufa a 37°C e a 5% de CO₂ e foram realizados repiques a cada quatro ou cinco dias, quando o sobrenadante das culturas foi coletado e mantido a -20°C até a purificação do anticorpo RB6.

A purificação do anticorpo foi realizada por precipitação utilizando solução saturada de sulfato de amônio (SSA) (Isofar, Duque de Caxias, RJ, Brasil) a 767 g/L, pH 7,2. Em síntese, foi adicionada a SSA gota a gota ao sobrenadante de cultura até obter-se uma solução a 45% de SSA. Este material foi mantido sob agitação a 4°C por 30 minutos e em seguida foi centrifugado a 1.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sedimento resultante foi lavado em solução SSA a 45%, e novamente centrifugado nas mesmas condições. Finalmente, o sedimento foi diluído em PBS, e mais uma vez procedeu-se a centrifugação. Desta vez o sedimento foi descartado, pois continha proteínas maiores do que o anticorpo, e o sobrenadante foi submetido a uma nova precipitação, agora em SSA a 40%. Após a precipitação e lavagem do sedimento em solução de SSA a 40%, o sedimento final foi diluído no menor volume possível de PBS, e o material foi dialisado em membrana de celulose (Sigma Chemical Co.) contra 20 L de PBS a 4°C. Por fim, foi realizada a quantificação do anticorpo pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Em seguida, testamos a concentração de anticorpo a ser usada nos experimentos. Camundongos BALB/c e C57BL/6 receberam injeções intraperitoneais com diferentes doses do anticorpo RB6 e a depleção de neutrófilos foi acompanhada por cinco dias por meio de contagem diferencial de pelo menos 200 células nucleadas em esfregaços sanguíneos. A dose escolhida para uso foi de 500 µg de anticorpo. Esta foi a menor dose que, em nossas mãos, induziu a depleção de 99% dos neutrófilos por pelo menos três dias. Em todos os experimentos de depleção de neutrófilos, cada animal recebeu uma única injeção intraperitoneal de 500 µg de anticorpo RB6 diluído em um volume de 200 µL de PBS dezesseis horas antes da infecção. Como controle, utilizamos 500 µg de IgG de rato purificada por precipitação com SSA.

O anticorpo 1A8 foi gentilmente cedido pelo Dr. David L. Sacks (National Institute of Allergy and Infectious Disease, Bethesda, MD, EUA). Para depleção de neutrófilos, 1 mg do

anticorpo 1A8 foi administrado por animal por via intraperitoneal dezesseis horas antes da infecção.

Para realização do ensaio de inibição da atividade da citocina IL-10, utilizamos o anticorpo monoclonal anti-receptor da IL-10, que também foi gentilmente cedido pelo Dr. David L. Sacks (National Institute of Allergy and Infectious Disease). Para inibição da IL-10, camundongos BALB/c foram inoculados por via intraperitoneal com 500 µg do anti-IL-10R a cada três dias durante a primeira semana de infecção. Como controle, camundongos submetidos ao mesmo curso de tratamento usando IgG de rato.

Em outro conjunto de experimentos nosso objetivo foi inibir a eliminação de imunocomplexos mediada por receptor de Fcγ. Para tal, utilizamos o anticorpo 2.4G2, que se liga especificamente e com alta afinidade aos domínios extracelulares de FcγRII and FcγRIII. Este anticorpo foi gentilmente cedido pelo Dr. Luís Carlos Crocco Afonso (Universidade Federal de Ouro Preto). Camundongos BALB/c foram inoculados por via intraperitoneal com 200 µg do anticorpo 2.4G2 nos dias 2, 4 e 6 após a infecção. Já foi demonstrado que 2.4G2 persiste na superfície das células por 4 a 6 dias (Araujo-Jorge *et al.*, 1993). Como controle, utilizamos 200 µg de imunoglobulina de rato.

3.6 – Medida da atividade de mieloperoxidase no sítio de infecção

Nos experimentos de cinética de migração de neutrófilos para o sítio de infecção, os camundongos foram eutanasiados 6, 12, 24, 72 e 168 horas após a infecção. Nos demais experimentos, os animais foram eutanasiados após 24 horas de infecção, e a migração de neutrófilos foi determinada pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO), uma enzima abundantemente expressa por neutrófilos, e que, portanto, é utilizada como um método indireto para quantificação de neutrófilos no tecido (Barcelos *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 1982). Assim, nos tempos determinados as orelhas dos animais infectados e não infectados foram coletadas e pesadas, e em seguida o tecido foi homogeneizado utilizando homogeneizador elétrico (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha) em tampão contendo NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02 M e Na₂EDTA 0,015 M (pH 4,7) na proporção de 1,9 mL de tampão para cada 100 mg de tecido, e o homogenato foi submetido a centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi descartado e o precipitado foi submetido a lise hipotônica, pela adição de NaCl 0,2% gelado (1,5 mL/100 mg de tecido),

seguido do mesmo volume de NaCl 1,6% contendo 5% de glicose gelado. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi diluído em tampão contendo Na₃PO₄ 0,05 M, 0,5% de HTAB (pH 5,4) na proporção 1,9 mL/100 mg de tecido. As amostras foram homogeneizadas e em seguida passaram por três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C. Após esse processamento, o material foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, 25 µL do sobrenadante foram adicionados em duplicata a placas de 96 poços para a realização do ensaio enzimático. Às amostras foram adicionados 25 µL de substrato TMB (3,3',5,5' – tetrametilbenzidina) (Sigma Chemical Co.) 1,6 mM em DMSO (dimetilsulfóxido), e a placa foi incubada por 5 minutos a 37°C. Após este período foram adicionados 100 µL de H₂O₂ (0,002%), e a placa foi incubada por mais 5 minutos a 37°C. Finalmente, foram adicionados 100 µL de H₂SO₄ 1 M e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 450 nm.

3.7 – Imunomarcção e citometria de fluxo

Orelhas e linfonodos drenantes da lesão de camundongos suficientes e deficientes de neutrófilos foram coletados 1, 3 e 7 dias após infecção com *L. amazonensis*. As faces dorsal e ventral das orelhas foram separadas e incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por uma hora e 30 minutos em 750 µL de meio RPMI contendo 125 µg/mL de Liberase TL (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 0,5 mg/mL de desoxiribonuclease I (Sigma Chemical Co.), 24 mM de NaHCO₃, 10 mM de HEPES (Sigma Chemical Co.), 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co.), 50 µM de β-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.), 50 U de penicilina por mL e 50 µg de estreptomicina por mL (Gibco® Life Technologies). Após o período de incubação, a reação foi terminada pela adição de EDTA 0,5 M (pH 8) e meio RPMI completo contendo 3% de SBF. As amostras foram então maceradas e filtradas em filtro em nylon com poro de 40 µm (Falcon cell strainer BD Biosciences). A suspensão de células foi centrifugada a 400 x g por 10 minutos a 4°C e o precipitado foi diluído em meio RPMI com 3% de SBF. Para marcação, foram adicionadas 1 x 10⁶ células por poço. As células foram incubadas por 15 minutos com misturas de anticorpos para marcação de moléculas de superfície: anti-Ly6G-PE, clone 1a8; anti-CD3-FITC, clone 145-2C11 e anti-CD4-PerCP, clone RM4-5. Exceto quando especificado o contrário, todos os anticorpos

utilizados foram da BD Biosciences Pharmingen (San Jose, CA, EUA). Utilizamos em todas as preparações o anticorpo anti-receptor Fc III/II (CD16/32) clone 2.4G2 (BD Biosciences Pharmingen) para bloqueio de tais receptores. As amostras foram lavadas duas vezes em PBS contendo 1% de SBF. As amostras marcadas apenas com marcadores de superfície foram lidas logo em seguida. A marcação intracitoplasmática para detecção do fator de transcrição Foxp3 foi desenvolvida sequencialmente. As células previamente marcadas com anticorpos contra as moléculas de superfície CD3 e CD4 foram fixadas em formaldeído 2% tamponado (Sigma Chemical Co.), permeabilizadas com tampão PermWash (BD Biosciences Pharmingen) e marcadas com anticorpo anti-Foxp3-PE, clone FJK-16s (eBioscience) de camundongo. Após a marcação intracitoplasmática, as células foram lavadas duas vezes em tampão PermWash e finalmente diluídas em PBS contendo 1% de BSA. Os dados foram imediatamente coletados utilizando FACSCan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA). Os controles de isotipos usados foram IgG1, IgG2a e IgG2b de rato. Para cada amostra, 50.000 eventos foram analisados utilizando o software FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, OR, EUA).

3.8 – Determinação da carga de parasitas por diluição limitante

A carga parasitária nas orelhas infectadas e nos linfonodos drenantes da lesão foi determinada através de diluição limitante (Vieira *et al.*, 1996) de uma suspensão de células obtida a partir da lesão ou do órgão. Em síntese, camundongos infectados suficientes ou deficientes de neutrófilos foram eutanasiados nos dias 1, 3 e 7 pós-infecção e homogenatos da lesão ou dos linfonodos foram obtidos após a maceração das orelhas ou dos linfonodos em meio Grace completo, respectivamente. Os homogenatos da lesão foram centrifugados a 50 x g por 4 minutos a 4°C para eliminação de restos de tecido, e o sobrenadante recuperado foi submetido a uma nova centrifugação, esta a 2.000 x g por 15 minutos a 4°C. Os homogenatos de linfonodos foram submetidos apenas à segunda centrifugação. O sedimento obtido foi diluído em 400 µL meio Grace completo. Duzentos µL dessa suspensão foram colocados em duplicata em placas de cultura de 96 poços e posteriormente foram serialmente diluídas na proporção de 1:4. As placas foram seladas e incubadas em estufa BOD a 25°C. A média do log₁₀ negativo do título de parasitos foi calculada sete dias após o início da cultura.

3.9 – Medida da atividade de arginase no sítio de infecção

A atividade de arginase do homogenato da lesão foi medida 3 e 7 dias após a infecção, como previamente descrito (Corraliza *et al.*, 1994) com algumas modificações. Brevemente, orelhas de camundongos não infectados ou infectados foram maceradas em meio Grace completo. Os homogenatos da lesão foram centrifugados a 250 x g por 4 minutos a 4°C para eliminação de restos de tecido, e o sobrenadante recuperado foi utilizado para dosagem da atividade de arginase no sítio de infecção. Foram utilizados 35 µL de homogenato. A lise das células foi realizada por meio de adição de 50 µL de Triton X-100, seguida de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação. A enzima arginase foi ativada pela adição de 50 µL de MnCl₂ a 10 mM e 50 µL de Tris-HCl a 50 mM (pH 7,5) e incubação a 55°C por 10 minutos. Posteriormente, 25 µL de L-arginina 0,5 mM (pH 9,7), o substrato da enzima, foram adicionados às amostras e incubados a 37°C por 60 minutos. Uma curva padrão de ureia foi produzida a partir de uma diluição seriada 1:2 de uma solução de ureia a 1 mg/mL. A reação foi parada com 400 µL de uma mistura de ácido H₂SO₄ : H₃PO₄ : H₂O (1:3:7). Subsequentemente, 25 µL de uma solução a 9% de 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxime em etanol 100% foram adicionados e a placa foi selada e incubada a 95°C por 45 minutos para o desenvolvimento da cor. Depois de 10 minutos de incubação no escuro, 100 µL de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura foi feita a 540 nm. Uma unidade de atividade da enzima é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 mM de ureia por minuto. O limite de detecção do ensaio foi de 270 mM de ureia.

3.10 – Cultura de linfócitos para dosagem de citocinas por ELISA

Camundongos BALB/c foram eutanasiados 3 e 7 dias após a infecção. Os linfonodos retromaxilares foram removidos, depositados em 2 mL de meio RPMI completo e mantidos em gelo. Em seguida, os órgãos foram macerados em triturador de vidro e centrifugados a 400 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento do linfonodo foi diluído em 500 µL de meio RPMI completo. As células foram colocadas em cultura na proporção de 5 x 10⁶ células/mL em placas de 24 poços na presença ou não de antígeno

particulado de *L. amazonensis* (50 µg/mL) em um volume total de 1 mL. Após 72 horas de incubação em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, o sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem de citocinas por ELISA.

Verificamos a produção de IL-4, IL-10, IL-17 e IFN-γ nos sobrenadantes de cultura de linfonodos. Os níveis de IFN-γ nos sobrenadantes coletados foram quantificado por ELISA usando para a captura anticorpo monoclonal de rato anti-IFN-γ (clone R46A2) e para a detecção soro de coelho policlonal específico anti-IFN-γ. A sensibilidade foi de 15,6 pg/mL. Na dosagem de IL-4, foram usados anticorpos anti-IL-4 (clone 11B11) e anti-IL-4 biotilado (clone BVD6) para captura e detecção da citocina IL-4, respectivamente. A sensibilidade para esta técnica foi de 15,6 pg/mL. Os anticorpos utilizados para a dosagem de IFN-γ e IL-4 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Luís Carlos Crocco Afonso da Universidade Federal de Ouro Preto. A produção de IL-10 foi medida usando o kit *Mouse IL-10 ELISA Set* (BD Biosciences Pharmingen), como indicado pelo fabricante (sensibilidade 31,25 pg/mL). A produção de IL-17 foi verificada utilizando o kit *Mouse IL-17A (homodimer) ELISA Ready-SET-Go!*, seguindo as instruções do fabricante. A sensibilidade deste ensaio foi de 7,8 pg/mL.

3.11 – Dosagem de IgG no soro por ELISA

Para a dosagem das imunoglobulinas IgG1 e IgG2a específicas para *L. amazonensis* no soro, camundongos BALB/c suficientes ou deficientes de neutrófilos foram anestesiados com 150 µL de solução anestésica contendo cloridrato de quetamina (Vertbrands) a 15 mg/mL e cloridrato de xilazina (Vertbrands) a 5 mg/mL e sangue foi obtido da veia femural. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 800 x g por 10 minutos a 4°C. O soro foi coletado e congelado a -20 °C.

As placas foram sensibilizadas com antígeno de *L. amazonensis* na concentração de 10 µg/mL diluído em tampão carbonato 0,05 M (pH 9,4) num volume de 100 µL/poço e incubadas por 18 horas a 4°C. No dia seguinte, os poços foram lavados 5 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05 % de Tween 20). Em seguida, foi adicionada a solução de bloqueio (5% de SBF em PBS) num volume de 200 µL/poço. As placas foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após um novo ciclo de lavagem, as amostras foram aplicadas na placa na diluição de 1:50 em PBS contendo 0,05% de Tween 20. Após 2 horas de incubação a 37°C, um novo ciclo de lavagem foi executado e os anticorpos ligados foram detectados com anti-

IgG1 e anti-IgG2a de camundongos diretamente conjugados com peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EUA) e diluídos 1: 2000 em PBS contendo 5% de SFB. Após 1 hora, as placas foram novamente lavadas com solução de lavagem e foi adicionado o substrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etil-benz-tiazolinosulfônico) (Sigma Chemical Co.). As placas foram lidas em um comprimento de onda de 405 nm com um leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

3.12 – Obtenção de macrófagos de medula óssea

Macrófagos derivados de medula óssea foram preparados como descrito em previamente (Zhang *et al.*, 2008). Camundongos C57BL/6 fêmeas com 6 a 8 semanas de idade foram utilizados para obtenção dos macrófagos derivados de medula óssea. Primeiramente, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e os ossos das patas posteriores (tíbia e fêmur) foram coletados. Com um bisturi estéril, as extremidades dos ossos foram removidas. Em seguida, foi inserida uma agulha 25G acoplada a uma seringa de 10 mL na extremidade do osso e PBS gelado livre de cálcio e magnésio suplementado com 2% de penicilina e estreptomicina foi injetado na cavidade óssea até que a mesma se tornasse branca. As células foram coletas em tubo cônico estéril de 50 mL e em seguida foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram diluídas em 15 mL de meio para macrófagos. O meio para macrófagos consiste em DMEM/F12 (Gibco® Life Technologies) suplementado com 10% de SBF, 10 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co.), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco® Life Technologies). Um mL de células progenitoras de medula óssea foi adicionado por placa de petri. Em seguida, foram adicionados 9 mL de meio para macrófagos contendo 15% de sobrenadante de cultura de células L-929 e as células progenitoras de medula óssea foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após 3 dias de incubação, foram adicionados mais 10 mL de meio para macrófago contendo 15% de sobrenadante de L-929. No dia 7, o sobrenadante de cultura foi removido e descartado. As placas foram lavadas duas vezes com PBS livre de cálcio e magnésio pré-aquecido (37°C). Após o descarte do PBS, foram adicionados 4 mL de Cellstripper™ (Cellgro®, Manassas, VA, EUA), uma solução de dissociação celular não enzimática, por placa e incubados por 10 minutos em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram removidas das placas e

transferidas para tubos cônicos e foi adicionado um volume igual de meio para macrófagos. As células foram centrifugadas e diluídas em meio para macrófagos, e foram adicionadas na concentração de 2×10^5 células/poço em placas de 48 poços; 2×10^6 células/poço em placas de 6 poços.

L-929 é uma linhagem celular de fibroblastos usada como fonte de M-CSF. As células L-929 foram cultivadas em meio para macrófago até se tornarem confluentes. O sobrenadante de cultura foi coletado, as células foram removidas por centrifugação e o sobrenadante de cultura foi estocado a -80°C até o momento do uso.

3.13 – Estimulação e infecção de macrófagos

Antes da estimulação e infecção dos macrófagos, estes foram incubados por 12 horas em meio para macrófago em estufa com 5% de CO_2 a 37°C na ausência de sobrenadante de L-929. No dia seguinte, as placas foram lavadas uma vez com PBS pré-aquecido (37°C) e foi adicionado meio para macrófago. Em seguida, os macrófagos foram estimulados com LPS (10 ng/mL), LPS (10 ng/mL) com 35 μL de uma solução de imunocomplexos (IC), que consiste de imunoglobulina anti-OVA de coelho + OVA, ou ácido hialurônico (HA) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O imunocomplexo foi preparado misturando OVA com um excesso de 10 vezes molar anti-OVA IgG em agitador magnético por 30 minutos a temperatura ambiente. Logo em seguida à estimulação, os grupos infectados receberam promastigotas em fase estacionária de crescimento ou promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas para cada macrófago. Em um experimento, também foram utilizadas amastigotas axênicas para a infecção também na proporção de 5 parasitas por macrófago. Em outro conjunto de experimentos, os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento na mesma proporção utilizada nos experimentos anteriores. A fim de inibir a atividade de IL-10, o anticorpo anti-IL-10 JES5-2A5 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi acrescentado simultaneamente aos estímulos. Em outro conjunto de experimentos, foi utilizado o inibidor altamente seletivo de MEK1 e MEK2, U0126 (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha). O inibidor foi diluído em DMSO (veículo da droga), sendo utilizado na concentração de 1 μM . O inibidor foi adicionado simultaneamente aos estímulos. Como controle, o veículo foi adicionado juntamente com os estímulos.

3.14 – Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos

Para dosagem de citocinas, o sobrenadante de cultura foi coletado após 8 ou 24 horas de estimulação/infecção. Os níveis de IL-10, IL-12 e TNF- α foram medidos por ELISA, utilizando os seguintes pares de anticorpos da BD Pharmingen: IL-12p40, C15.6 e C17.8; IL-10, JES5-2A5 e JES5-16E3; TNF- α , G281-2626 e MP6-XT22, conforme as instruções do fabricante.

3.15 – Detecção de mRNA por transcrição reversa e PCR em tempo real

3.15.1 – Extração de RNA

Para avaliar a expressão de genes em macrófagos de medula óssea, tais células foram cultivadas em placas de 6 poços na concentração de 2×10^6 células/poço. Após 5 horas, o sobrenadante de cultura foi removido e foi adicionado 1 mL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por poço. As amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, o conteúdo dos poços foi transferido para microtubos de 1,5 mL. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram homogeneizadas, incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos e, então, centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em uma fase inferior cor de rosa composta por fenol-clorofórmio, uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente superior. O RNA permaneceu na fase aquosa, que foi transferida para um microtubo novo. Para precipitar o RNA da fase aquosa, foram adicionados 500 μ L de isopropanol (Merck) e a mistura foi incubada por 12 horas a -20°C. No dia seguinte, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi lavado em 400 μ L de etanol (Merck) 80% em água tratada com DEPC (USB Corp., Cleveland, OH, EUA) e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e permitiu-se que o precipitado secasse por 5 a 10 minutos. O RNA precipitado foi diluído em 20 μ L de água de alta qualidade livre de

DNase e RNase, e armazenado a -80°C . A quantificação de RNA foi realizada utilizando o espectrômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Foram consideradas apropriadas as amostras que apresentaram uma relação ácido nucléico/proteína (OD260/OD280) entre os valores de 1,6 e 2,0.

3.15.2 – Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído como indicado acima. Foi utilizado um volume final de reação de 20 μL , contendo 2 μg de RNA diluídos em 11,5 μL de água livre de DNase e RNase, 4 μL de solução tampão 5X da transcriptase reversa ThermoScript™, 2 μL de dNTPs a 10 mM, 1 μL de DTT a 100 mM, 1 μL do iniciador oligo (dT)₂₀ a 50 μM , 1 μL RNaseout, inibidor de ribonuclease a 40 U/ μL e 0,5 μL da enzima transcriptase reversa ThermoScript™ a 15 U/ μL . Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Invitrogen. A mistura foi levada a um termociclador, onde as amostras foram incubadas por uma hora a 60°C , 5 minutos a 85°C , em seguida as amostras foram resfriadas até 37°C e foi adicionado 1 μL de RNase H a 10 U/ μL (Invitrogen). As amostras foram incubadas por 20 minutos a 37°C , e finalmente foram resfriadas e mantidas a 4°C até que as amostras serem recolhidas do termociclador. O cDNA, produto da reação, foi diluído com 179 μL de água livre de DNase e RNase.

3.15.3 – Amplificação específica por Real time PCR

A amplificação de sequências específicas de mRNA foi realizada através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) usando iniciadores com sequências específicas para IL-10, senso 5'- GAC TTT AAG GGT TAC TTG GGT TGC -3', anti-senso 5'- TCT TAT TTT CAC AGG GGA GAA ATC G -3'; e para iNOS, senso 5'- CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C -3', anti-senso 5'- GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G -3'. As reações foram desenvolvidas no sistema de PCR em tempo real LightCycler® 480 (Roche) usando 5 μL de cDNA em volume total de 25 μL de mistura de PCR. Todas as

reações foram desenvolvidas em triplicatas usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante. A quantificação relativa do produto foi determinada pelo método de limiar de ciclos para determinar o incremento em vezes do produto. O programa de PCR para amplificação de cDNA foi desenvolvido sob as seguintes condições: ativação da enzima a 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto durante 40 ciclos. Para a geração da curva de dissociação, as amostras foram aquecidas a 95°C por 15 segundos, em seguida a 60°C por 1 minuto e novamente a 95°C por 15 segundos. Finalmente, as amostras foram esfriadas por 1 minuto a 4°C. Os genes de interesse foram normalizados em relação à expressão da enzima expressa constitutivamente gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), senso 5'- AAG GTC GGT GTG AAC GGA TTT -3', anti-senso 5'- AAT TTG CCG TGA GTG GAG TCA TAC -3', baseado no cálculo do $\Delta\Delta CT$. A mudança na expressão foi representada como relativa aos macrófagos não estimulados.

3.16 – Quantificação do crescimento intracelular da *Leishmania* dentro dos macrófagos

Para determinar o crescimento dos parasitas dentro dos macrófagos, 1×10^5 macrófagos derivados de medula óssea foram adicionados a lamínulas de 3 cm colocadas nos poços de placas de 24 poços. Um grupo de macrófagos foi ativado com IFN- γ (100 U/mL). As células foram incubadas até o dia seguinte em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram lavadas duas vezes com PBS a 37°C e meio para macrófago foi adicionado. Em seguida, foram adicionados os estímulos e as células foram infectadas com formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitas por macrófago. As células foram incubadas por uma hora e trinta minutos em estufa com 5% de CO₂ a 34°C. Após a internalização dos parasitas, os macrófagos foram lavados três vezes com PBS pré-aquecido e foi adicionado novamente o meio para macrófago com os estímulos. As células foram incubadas novamente em estufa com 5% de CO₂ a 34°C. Após 3 horas de infecção, um grupo de macrófagos recebeu IFN- γ (100 U/mL). As lamínulas foram fixadas com metanol gelado 2 ou 72 horas após a infecção para realização de ensaio de imunofluorescência. As lamínulas obtidas após 2 horas de infecção serviram como controle para garantir que houve o mesmo grau de internalização de promastigotas entre os grupos. O bloqueio foi feito pela adição de PBS contendo 2% de BSA (solução bloqueio) e incubação por 2 horas a temperatura

ambiente. Para detecção dos parasitas, as lamínulas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente com anticorpo policlonal de camundongo preparado contra *L. amazonensis* na diluição de 1:50 em solução bloqueio. As lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e em seguida foi adicionado anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com FITC (BD Pharmingen) na diluição de 1:750 em solução bloqueio. Para marcação do núcleo, as amostras foram incubadas com 10 µg/mL de DAPI (Invitrogen). Para montagem das lâminas foi utilizado mowiol contendo 0,01% de PPD (p-fenilenediamina). As lâminas foram examinadas utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Axio Observer Inverted Microscope, Carl Zeiss, Inc., Jena, Alemanha). Os resultados foram expressos como número de parasitas por 100 macrófagos. Pelo menos 300 macrófagos, em triplicata, foram analisados por grupo.

3.17 – Medida da atividade de arginase e da produção de óxido nítrico por macrófagos

A atividade de arginase foi medida nos lisados de culturas de macrófagos. Para este ensaio, 5×10^5 células foram cultivadas em placas de 48 poços na presença dos devidos estímulos e/ou na presença de promastigotas de *L. amazonensis*. Após 24 horas de infecção, o sobrenadante de cultura foi removido e utilizado para dosagem de citocinas e para detecção de nitrito (ensaio de Griess) e as células foram lavadas duas vezes com PBS e, em seguida, foram lisadas com 50 µL/poço de uma solução a 0,1% de Triton X-100. As amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida as amostras foram processadas conforme descrito acima no tópico 3.9.

A produção de óxido nítrico foi estimada pelo acúmulo de NO_2^- no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis* por 24 horas utilizando a reação de Griess. Primeiramente, em uma placa de 96 poços foi produzida uma curva padrão de NaNO_2 a partir de uma diluição seriada 1:2 de uma solução de NaNO_2 a 125 µM. Em seguida, 50 µL de sobrenadante de cultura foram transferidos para a placa de 96 poços. Posteriormente foram adicionados 50 µL de ácido sulfanílico (1% de sulfanilamida em ácido fosfórico a 2,5%), seguido de igual volume de naftiletenodiamina (0,1% de naftiletenodiamina em ácido fosfórico a 2,5%). As placas foram lidas em um comprimento de onda de 540 nm com um leitor de microplacas (Molecular Devices).

3.18 – Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão para cada grupo. Nos ensaios de cinética de migração de neutrófilos foi realizado o teste de análise de variância bifatorial (*two-way* ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni para determinar diferenças estatisticamente significativas entre os tempos e os grupos avaliados. A fim de estabelecer diferenças entre três ou mais grupos usamos o teste de análise de variância simples (*one-way* ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Nos demais ensaios, utilizamos o teste Mann-Whitney para determinar diferenças entre dois grupos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prisma versão 4. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – Cinética de recrutamento de neutrófilos para o local da infecção e eficiência do tratamento com anticorpo monoclonal RB6-8C5 na prevenção do acúmulo de neutrófilos

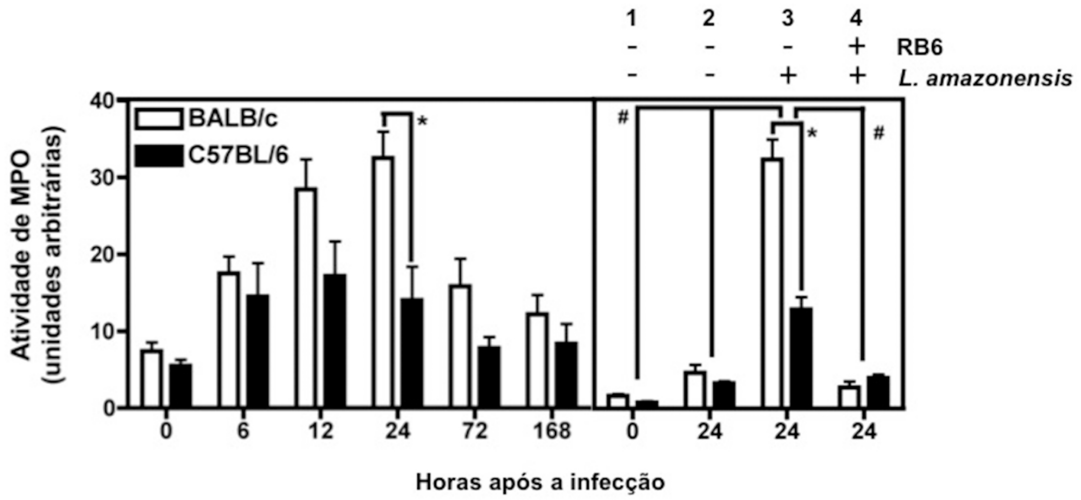
Antes de estudar o papel dos neutrófilos durante a infecção por *L. amazonensis*, foi importante determinar a cinética de recrutamento de neutrófilos em resposta à inoculação do parasita. Para tal, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados na orelha com 1×10^6 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* e nos tempos indicados a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), que correlaciona com o acúmulo de neutrófilos, foi avaliada. Como pode ser visto no painel esquerdo do gráfico 1A, após seis horas de infecção neutrófilos foram encontrados tanto em camundongos BALB/c quanto nos C57BL/6. Em ambos os camundongos, o pico de atividade de MPO ocorreu entre 12 e 24 horas após a infecção. Após 72 horas, nós observamos uma diminuição da atividade de MPO. É interessante destacar que apesar de termos encontrado um perfil de cinética de atividade de MPO semelhante nas orelhas de camundongos BALB/c e C57BL/6, camundongos BALB/c apresentaram atividade de MPO significativamente maior em comparação com camundongos C57BL/6 após 24 horas de infecção. A fim de confirmar esses dados, nós realizamos uma análise por citometria de fluxo para examinar a presença de neutrófilos nas orelhas durante a infecção (gráfico 1B e 1C). Para a detecção dos neutrófilos utilizamos um anticorpo anti-Ly6G marcado com o fluoróforo FITC. Foram considerados neutrófilos todas as células que expressaram altos níveis de Ly6G (Ly6G^{high}). Nossos dados revelam que a cinética de acúmulo de neutrófilos (células Ly6G^{high}) nas orelhas correlaciona bem com a cinética de atividade de MPO, confirmando que há migração de neutrófilos para o local da infecção durante o primeiro dia de infecção e que o número de neutrófilos cai dramaticamente a partir do terceiro dia. Além disso, nossos dados confirmam que a medida da atividade de MPO é um técnica barata e segura de verificar o acúmulo de neutrófilos no tecido.

Com o objetivo de entender o papel dos neutrófilos nos estágios iniciais da infecção, usamos como estratégia a depleção destas células antes da infecção, utilizando para tal o anticorpo monoclonal anti-Ly6G/Ly6C clone RB6-8C5. Após testar diferentes doses do anticorpo, optamos por realizar o tratamento com 500 µg de RB6 por via intraperitoneal

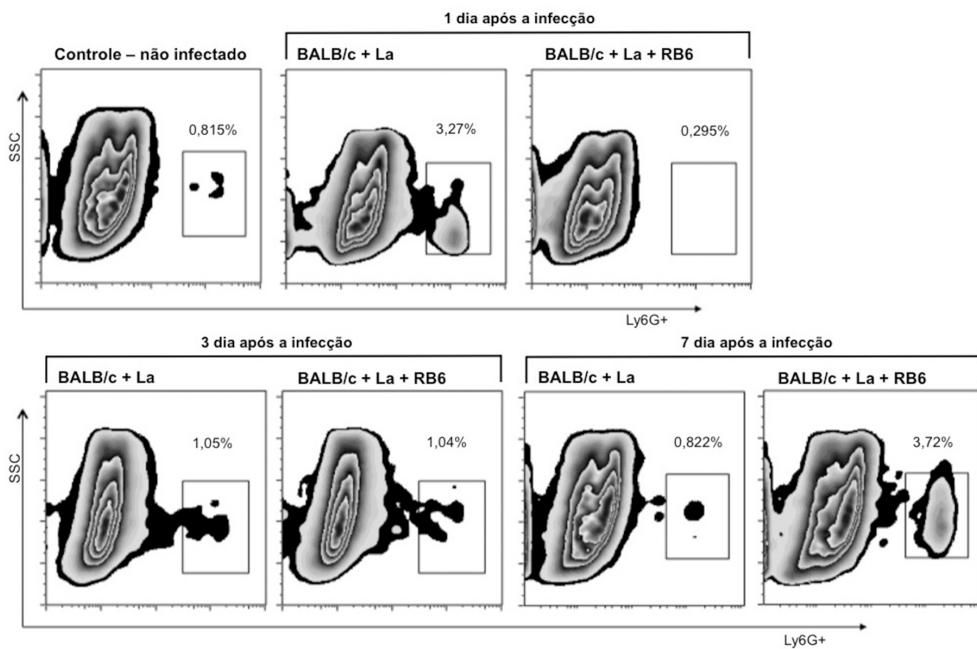
dezesseis horas antes da infecção. A dose utilizada foi a menor dose que, em nossas mãos, foi capaz de induzir a depleção de 99% dos neutrófilos por pelo menos 48 horas. Como exposto nos gráficos 1A painel esquerdo, 1B e 1C, o tratamento com o anticorpo monoclonal RB6 foi bastante eficiente para inibir o acúmulo de neutrófilos no local da infecção. O tratamento com RB6 aboliu completamente o acúmulo de neutrófilos nas orelhas infectadas após um dia de infecção. Três dias após a infecção, o número de neutrófilos no grupo tratado com RB6 aumentou, atingindo níveis semelhantes aos encontrados no grupo não tratado. Após sete dias, a percentagem e o número absoluto de neutrófilos no sítio de infecção tornaram-se maiores do que aqueles encontrados no grupo não tratado. Por outro lado, o tratamento com um anticorpo controle não relacionado (imunoglobulina de rato) não afetou a atividade de MPO, indicando que o tratamento com um anticorpo não relacionado não causa alteração no padrão de migração de neutrófilos para o sítio de infecção (gráfico 1D).

Outro objetivo nosso foi avaliar se a migração dos neutrófilos estava ocorrendo em função da inoculação do parasita ou se o dano tecidual causado pela introdução da agulha na orelha era suficiente para promover o acúmulo destas células. Para tal, camundongos receberam inoculação intradérmica de 10 μ L de PBS, simulando o volume de parasitas injetados na orelha. Nossos resultados indicam que o dano provocado pela agulha induz apenas um pequeno aumento no acúmulo de neutrófilos após 24 horas e a análise estatística desses resultados mostrou que a atividade de MPO neste tempo não foi diferente daquelas observadas nos controles não infectados e nos animais tratados com RB6 ($p > 0,05$ pelo teste de comparações múltiplas de Tukey) (gráfico 1A). Por outro lado, a infecção por *L. amazonensis* induziu uma forte aumento na atividade de MPO quando comparado com o grupo de camundongos que foi injetado com PBS ($p < 0,001$ pelo teste de comparações múltiplas de Tukey). Nossos dados indicam que o acúmulo de neutrófilos durante as primeiras 24 horas pós-infecção requer a presença do parasita.

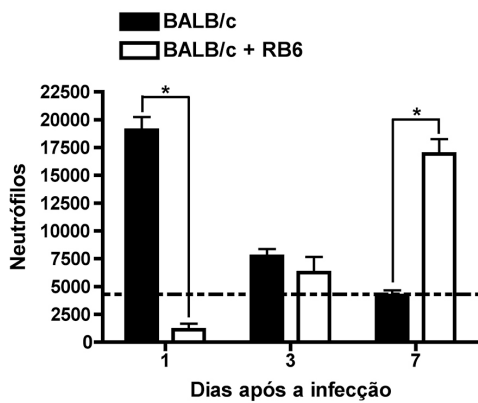
A



B



C



D

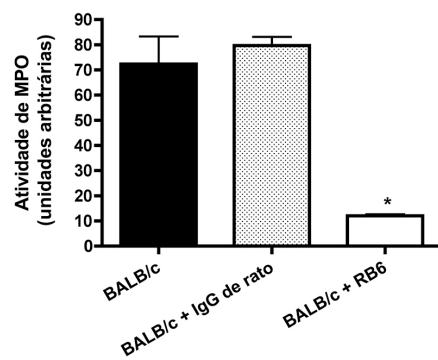


Gráfico 1: Cinética de recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção por *L. amazonensis*. (A) *Painel esquerdo*. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados na orelha por via intradérmica com 1×10^6 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Nos tempos indicados, as orelhas foram coletadas e atividade de MPO foi avaliada. Foi observada diferença estatística entre grupos (BALB/c e C57BL/6) e tempos (análise de variância bifatorial). * indica $p < 0,001$ (teste de Bonferroni). (A) *Painel direito*, atividade de MPO detectada nas orelhas de camundongos BALB/c e C57BL/6 que receberam um dos seguintes tratamentos: (1) animais não infectados; (2) inoculação de solução salina (PBS) por via intradérmica na orelha; (3) infecção com 1×10^6 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*; (4) tratamento com 500 μg de anticorpo monoclonal anti-Ly6G/Ly6C clone RB6-8C5 (RB6) dezesseis horas antes da infecção com 1×10^6 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Vinte e quatro horas após a infecção, os camundongos foram eutanasiados e as orelhas foram coletadas para avaliação da atividade de MPO. # indica $p < 0,001$, * indica $p < 0,01$ (análise de variância simples seguida do teste de Tukey). Camundongos BALB/c foram tratados com RB6 (500 μg) dezesseis horas antes da infecção com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Nos tempos indicados, os animais foram eutanasiados e as orelhas foram coletadas e processadas para imunofenotipagem por citometria de fluxo (B e C). A cinética de acumulação de neutrófilos no sítio de infecção é representada pela percentagem de células Ly6G⁺ nos tempos indicados (B). O número absoluto de neutrófilos no local da infecção em camundongos BALB/c é mostrado na Gráfico C. Em (D), camundongos BALB/c não tratados ou tratados com 500 μg de RB6 ou de IgG de rato foram infectados com 1×10^6 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Após 24 horas, a atividade de MPO foi quantificada. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney). Os dados representam média \pm erro padrão de 4-6 animais/grupo. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

4.2 – Neutrófilos limitam o desenvolvimento inicial de lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*

Para avaliar o efeito da depleção de neutrófilos no curso de infecção por *L. amazonensis*, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram tratados com 500 µg do anticorpo RB6 dezesseis horas antes da infecção com 1×10^6 formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*, e o desenvolvimento das lesões foi monitorado semanalmente. Como visto no gráfico 2A, o tratamento com RB6 resultou em um desenvolvimento acelerado de lesões em camundongos BALB/c durante a primeira semana após a infecção, no entanto à medida que a doença progrediu o curso de infecção foi semelhante nos dois grupos. Por outro lado, a depleção de neutrófilos não afetou o curso de infecção por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6 (gráfico 2A).

Apesar de termos encontrado diferenças apenas durante a primeira semana após a infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, tais diferenças foram bastante consistentes e nos levaram a investigar com maior profundidade os estágios iniciais de infecção. Assim, nós resolvemos acompanhar o curso de infecção diariamente durante a primeira semana de infecção. Nossos dados revelaram que o grupo tratado com RB6 apresentou um aumento na espessura da orelha com relação ao grupo não tratado logo no segundo dia após a infecção (gráfico 2B). É interessante destacarmos que enquanto os camundongos não depletados praticamente não apresentaram aumento na espessura da orelha durante a primeira semana de infecção, nos camundongos deficientes de neutrófilos a espessura das orelhas praticamente duplicou após sete dias de infecção (gráfico 2C). Por outro lado, o tratamento com um anticorpo controle não relacionado (imunoglobulina de rato) não afetou o curso de infecção (inserto no gráfico 2B). Estes resultados indicam que a presença dos neutrófilos no momento da infecção é importante para o controle inicial do desenvolvimento de lesões em camundongos BALB/c durante a infecção com *L. amazonensis*, visto que a depleção de neutrófilos exacerbou as lesões nestes camundongos. Por outro lado, a depleção de neutrófilos não teve efeito sobre o curso de infecção em camundongos C57BL/6, nem mesmo nos estágios iniciais da doença (gráfico 2B).

Um ponto importante em nossos experimentos foi que o esquema de tratamento que nós usamos nos ensaios de depleção de neutrófilos resultou no desaparecimento destas células apenas por dois dias. Os níveis de neutrófilos no local da infecção observado no grupo depletado de neutrófilos retornam aos níveis observados no animal não depletado no terceiro

dia pós-infecção, e após sete dias havia mais neutrófilos nos animais depletados. Isto nos levou a questionar se essa aceleração no desenvolvimento de lesões observada nos camundongos deficientes em neutrófilos se devia a ausência destas células no momento da infecção, ou se isto se devia ao aumento subsequente nos números de neutrófilos observado neste grupo. Assim, nós resolvemos depletar os neutrófilos durante toda a primeira semana de infecção. Para tal, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram tratados com 500 µg de RB6 nos dias -1, 1, 3, 5 e 7 após a infecção por *L. amazonensis* e o desenvolvimento de lesões foi monitorado a cada duas semanas (gráfico 2C). A depleção de neutrófilos durante toda a primeira semana de infecção teve efeitos mais dramáticos do que a depleção de neutrófilos apenas durante as primeiras 48 horas de infecção em camundongos BALB/c. Camundongos depletados de neutrófilos apresentaram um aumento na espessura das orelhas em comparação com os camundongos suficientes de neutrófilos até a oitava semana pós-infecção quando o experimento foi encerrado. Esses resultados suportam a ideia de que neutrófilos tem um papel protetor durante os estágios iniciais de infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c. As diferenças observadas entre a depleção de neutrófilos por apenas dois dias ou por uma semana inteira podem indicar que a migração atrasada de neutrófilos observado no dia sete pós-infecção em camundongos que receberam uma única injeção de RB6 parece proteger tais animais de uma exacerbação ainda maior do desenvolvimento de lesões. Com relação aos camundongos C57BL/6, nem mesmo a depleção de neutrófilos durante toda a primeira semana de infecção foi suficiente para alterar o curso de infecção, confirmando que neutrófilos não apresentam um papel importante na infecção por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6.

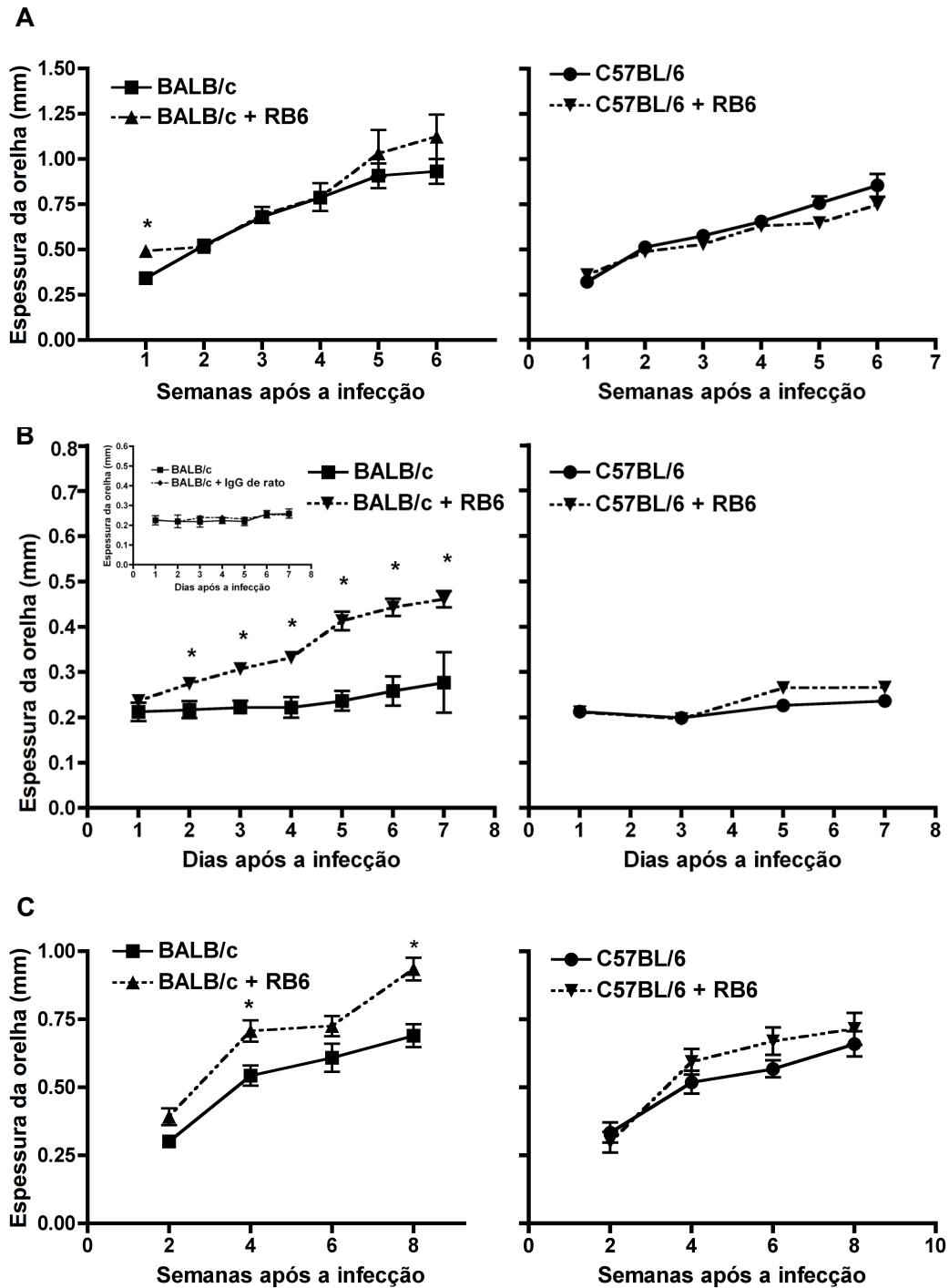


Gráfico 2: Curso de infecção após a depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c e C57BL/6. Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados na orelha por via intradérmica com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. O grupo tratado com RB6 recebeu uma única injeção i.p. de RB6 (500 μ g) dezesseis horas antes da infecção (A, B). A espessura da orelha foi monitorada semanalmente (A). Em B, o desenvolvimento de lesões foi monitorado diariamente durante a primeira semana de infecção. O inserto em (B) mostra que o tratamento com 500 μ g de soro de rato dezesseis horas antes da infecção não afeta o curso de infecção em camundongos BALB/c. Em (C), camundongos BALB/c e C57BL/6 foram infectados como descrito acima e os grupos tratados com RB6 receberam injeções i.p. de RB6 (500 μ g) nos dias -1, 1, 3, 5 e 7 e a espessura da orelha foi monitorada a cada duas semanas. Os dados representam média \pm erro padrão de 5-10 animais/grupo. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.3 – Neutrófilos são requeridos para o controle inicial da carga de parasitas em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*

Uma vez que demonstramos que neutrófilos limitam o desenvolvimento de lesões durante a primeira semana de infecção, nosso próximo objetivo foi avaliar se há envolvimento destas células no controle da carga de parasitas durante os estágios iniciais da infecção. Para tal, nós estimamos a carga de parasitas utilizando o método de diluição limitante nas orelhas infectadas e nos linfonodos drenantes da lesão, na ausência ou na presença de neutrófilos. Camundongos BALB/c deficientes de neutrófilos apresentaram um aumento de dez vezes (um log) na carga de parasitas observada no local da infecção e nos linfonodos drenantes sete dias após a infecção em comparação com os camundongos suficientes de neutrófilos (gráficos 3A e 3C). Esses resultados indicam que os neutrófilos poderiam estar restringindo a proliferação do parasita nos estágios iniciais da infecção. Para confirmar esta hipótese, nós estimamos a carga de parasitas em camundongos BALB/c após um dia de infecção. Nós observamos que camundongos infectados na ausência de neutrófilos apresentaram aproximadamente dez vezes mais parasitas tanto nas orelhas quanto nos linfonodos drenantes da lesão do que camundongos suficientes de neutrófilos (gráfico 3G e 3H). Assim, nós demonstramos que neutrófilos parecem limitar não apenas o desenvolvimento de lesões como também o crescimento do parasita nos estágios iniciais da infecção em camundongos BALB/c.

Arginase I é um importante fator na patogênese das leishmanioses (Iniesta *et al.*, 2005; Kropf *et al.*, 2005). Esta enzima hidrolisa L-arginina em ureia e ornitina, a qual é utilizada para produção de poliaminas que são moléculas que favorecem a proliferação do parasita *Leishmania* no interior de suas células hospedeiras. A fim de determinar se o aumento da carga de parasitas correlaciona com um aumento da atividade da enzima arginase, nós quantificamos a atividade de arginase nas orelhas infectadas de camundongos suficientes e deficientes de neutrófilos. Primeiramente, observamos que a infecção por *L. amazonensis* resulta apenas em um pequeno aumento na atividade de arginase quando comparado com as orelhas não infectadas em camundongos BALB/c (linha tracejada, gráfico 3E). Em conformidade com o aumento no título de parasitas encontrado, a depleção de neutrófilos provocou um aumento significativo na atividade de arginase no local da inoculação uma semana após a infecção (gráfico 3E). Assim, houve uma correlação direta entre aumento da atividade de arginase e aumento da carga de parasitas em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e depletados de neutrófilos, de modo que a maior disponibilidade de

poliaminas pode estar favorecendo a replicação do parasita. Quanto aos camundongos C57BL/6, a depleção de neutrófilos não alterou a carga de parasitas ou a atividade de arginase durante a primeira semana de infecção (gráficos 3B, 3D e 3F) e esses dados estão em concordância com o fato de a depleção de neutrófilos não afetar o curso de infecção por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6. Uma vez que não observamos nenhum efeito da depleção de neutrófilos em camundongos C57BL/6 passamos a estudar apenas os camundongos BALB/c.

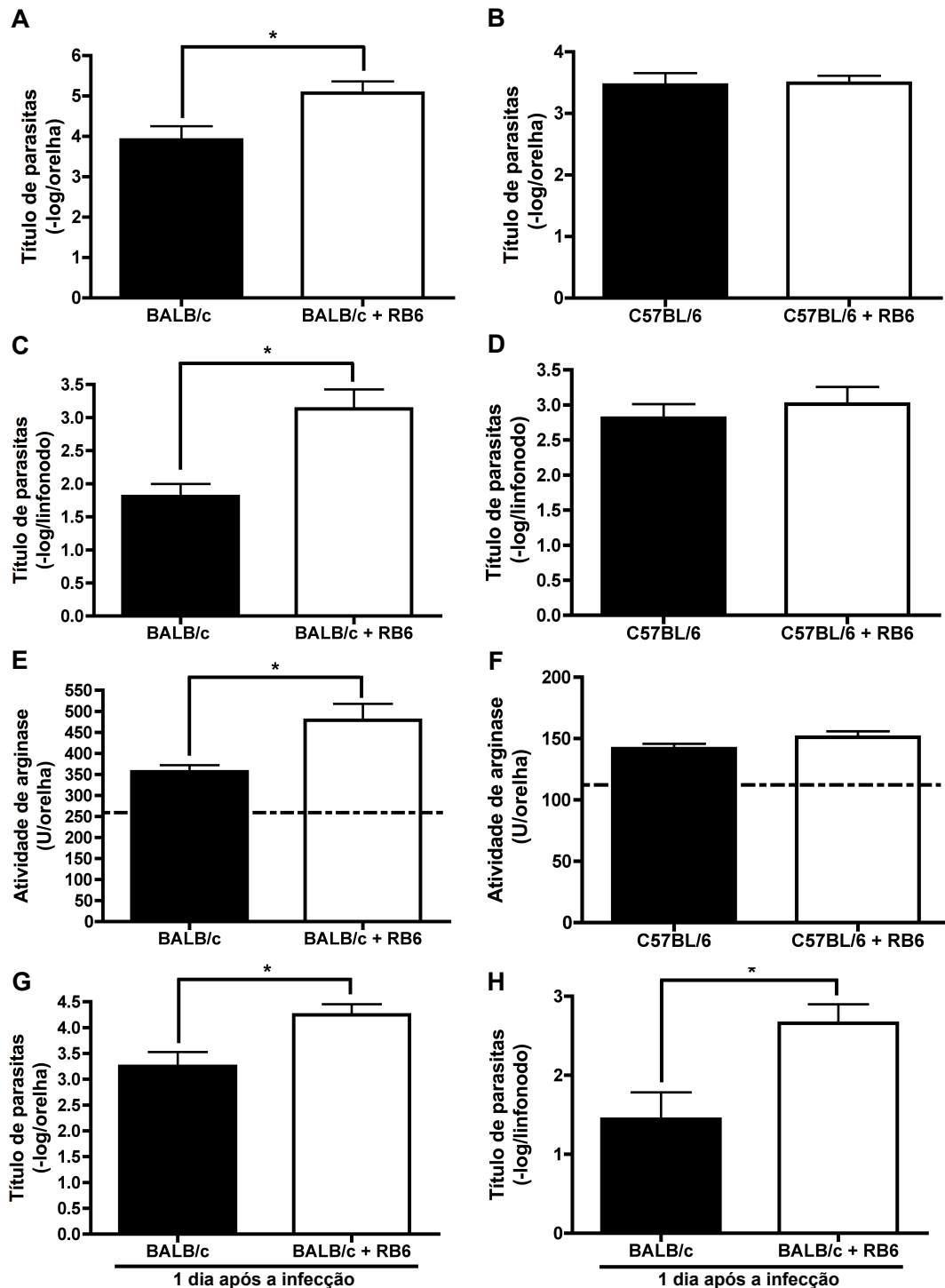


Gráfico 3: A depleção de neutrófilos aumenta a carga de parasitas e a atividade de arginase em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Camundongos BALB/c (A, C, E, G e H) e C57BL/6 (B, D e F) foram tratados com 500 µg de RB6 e dezesseis horas depois foram infectados na orelha com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Uma semana após a infecção, as orelhas foram coletadas para determinação da carga de parasitas por diluição limitante (A e B) e da atividade de arginase (E e F). Os linfonodos drenantes da lesão também foram coletados para avaliação da carga de parasitas (C e D). A linha tracejada em E e F representa a atividade de arginase detectada em orelhas não infectadas. Os dados representam média ± erro padrão de 5-6 animais/grupo. Os resultados são representativos de pelo menos três experimentos independentes. O título de parasitas nas orelhas (G) e nos linfonodos (H) também foi verificado por diluição limitante em camundongos BALB/c após 1 dia de infecção. Os dados representam a média ± erro padrão de 5-6 animais/grupo. Os resultados são a média de dois experimentos independentes. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.4 – A depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c causa um aumento na secreção de IL-17 e IL-10 por células dos linfonodos drenantes durante respostas de re-estimulação antigênica

Nosso próximo objetivo foi avaliar o efeito da depleção de neutrófilos sobre a produção inicial de citocinas por células dos linfonodos drenantes da lesão. Com este propósito, nós realizamos ensaios de re-estimulação *in vitro* de células dos linfonodos de camundongos suficientes e deficientes de neutrófilos obtidas nos dias três ou sete pós-infecção com antígeno de *L. amazonensis* e avaliamos a secreção de IL-4, IFN- γ , IL-10 e IL-17 por ELISA. Encontramos um dado bastante interessante: a infecção com *L. amazonensis* resultou na produção de altos níveis de IL-4 (1 ng/mL) e de IFN- γ (5 ng/mL) durante a primeira semana de infecção (gráficos 4A e 4B). No entanto o tratamento com RB6 não afetou a produção destas citocinas por células dos linfonodos nos tempos de três (dado não mostrado) e sete dias após a infecção (gráficos 4A e 4B). Quando nós avaliamos a produção de IL-17, nós observamos que células dos linfonodos produziram altos níveis de IL-17 três dias após a infecção (gráfico 4C), porém os níveis de IL-17 diminuíram drasticamente no dia sete pós-infecção (dado não mostrado). A depleção de neutrófilos produziu um expressivo aumento na produção de IL-17 no dia três pós-infecção (gráfico 4C). É importante enfatizar que mesmo quando células de linfonodo obtido de camundongo depletado de neutrófilos não foram estimuladas com antígeno de *L. amazonensis* houve secreção de altos níveis de IL-17. Finalmente avaliamos a produção de IL-10. Células de linfonodo estimuladas com antígeno de *L. amazonensis* produziram altos níveis de IL-10 tanto no dia três como no dia sete após a infecção (gráfico 4D). A depleção de neutrófilos resultou em um aumento significativo nos níveis de IL-10 após sete dias de infecção (gráfico 4D). Assim, nossos dados revelaram que a depleção de neutrófilos aumentou a secreção de IL-10 e IL-17 por células de linfonodo durante respostas *in vitro* de estimulação antigênica.

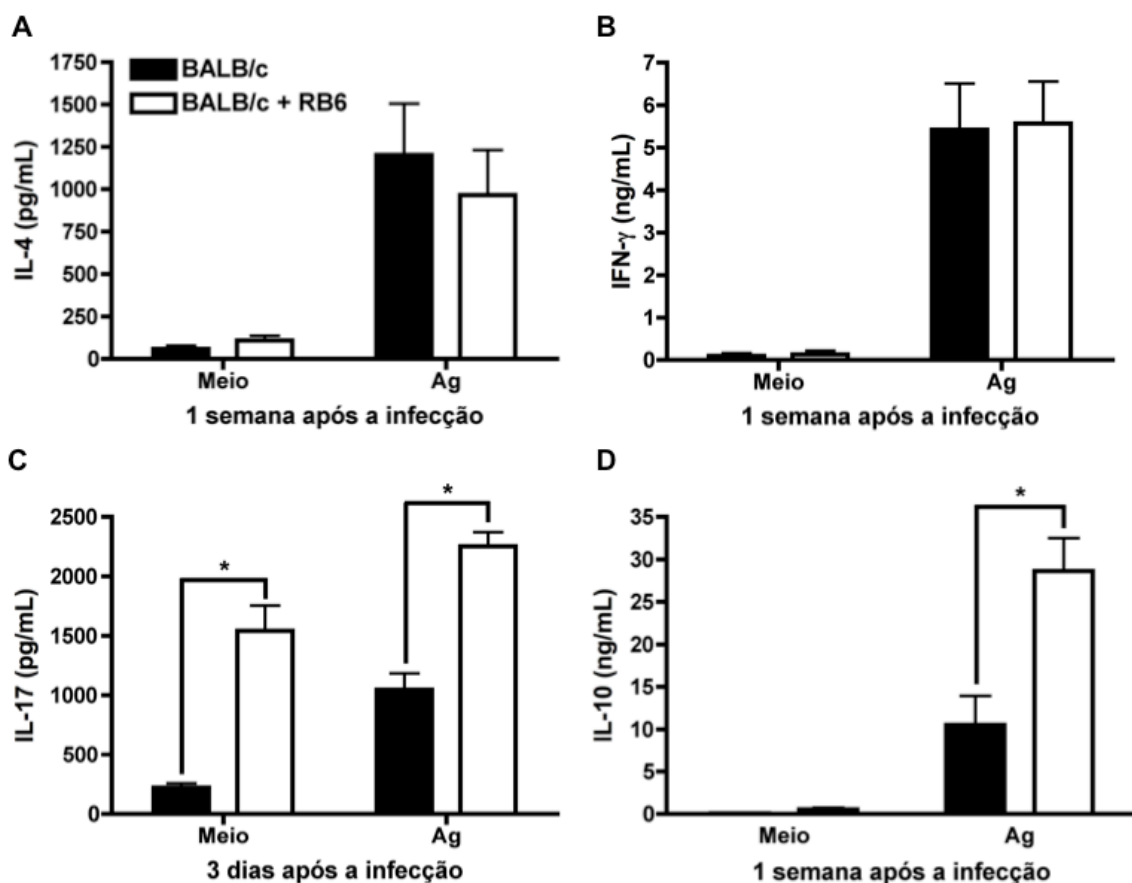


Gráfico 4: Efeito da depleção de neutrófilos sobre a secreção de IL-4, IFN- γ , IL-10 e IL-17 por células dos linfonodos drenantes da lesão em respostas de re-estimulação antigênica *in vitro*. Camundongos BALB/c foram tratados com 500 μ g de RB6 e dezesseis horas depois foram infectados na orelha com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Células dos linfonodos drenantes da lesão foram coletadas nos dias três ou sete pós-infecção e estimuladas com antígeno de *L. amazonensis* (Ag). Após 72 horas, os sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem dos níveis de IL-4 (A), IFN- γ (B), IL-17 (C) e IL-10 (D) por ELISA. Os dados representam média \pm erro padrão de 5-6 animais/grupo. Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.5 – O tratamento com o anticorpo monoclonal 1A8 produz resultados semelhantes aos encontrados no tratamento com RB6

O anticorpo RB6-8C5 tem sido bastante utilizado para depletar neutrófilos em camundongos. Apesar de RB6 ligar-se com alta afinidade a Ly6G, uma molécula expressa especificamente em neutrófilos, tem sido muito aceito recentemente que este anticorpo também se liga, porém com baixa afinidade, a Ly6C, que é expressa em neutrófilos, células dendríticas e subpopulações de linfócitos e monócitos. Por outro lado, o anticorpo 1A8 liga-se especificamente a Ly6G (Daley *et al.*, 2008). Deste modo, a fim de confirmar que os eventos observados até agora estão associados à depleção específica de neutrófilos, nós tratamos camundongos BALB/c com 1 mg do anticorpo 1A8 por via intraperitoneal dezesseis horas antes da infecção por *L. amazonensis*. Embora seja específico, o anticorpo 1A8 não foi tão eficiente quanto o anticorpo RB6, o último eliminou 99% dos neutrófilos da circulação dos camundongos, enquanto 1A8 foi capaz de depletar apenas 85% dos neutrófilos. Nossos dados demonstram que o tratamento com ambos os anticorpos produziu resultados similares. A depleção de neutrófilos com o anticorpo 1A8 resultou em aumento do tamanho das lesões (gráfico 5A), elevação da carga de parasitas (gráfico 5B) associada com a uma maior atividade de arginase (gráfico 5C) e um aumento na secreção de IL-10 durante re-estimulação *in vitro* de células de linfonodo (gráfico 5D). Estes dados validam os nossos experimentos realizados com o anticorpo RB6-8C5 e sugerem que de fato os eventos observados neste trabalho se devem à depleção de neutrófilos e não de outras células.

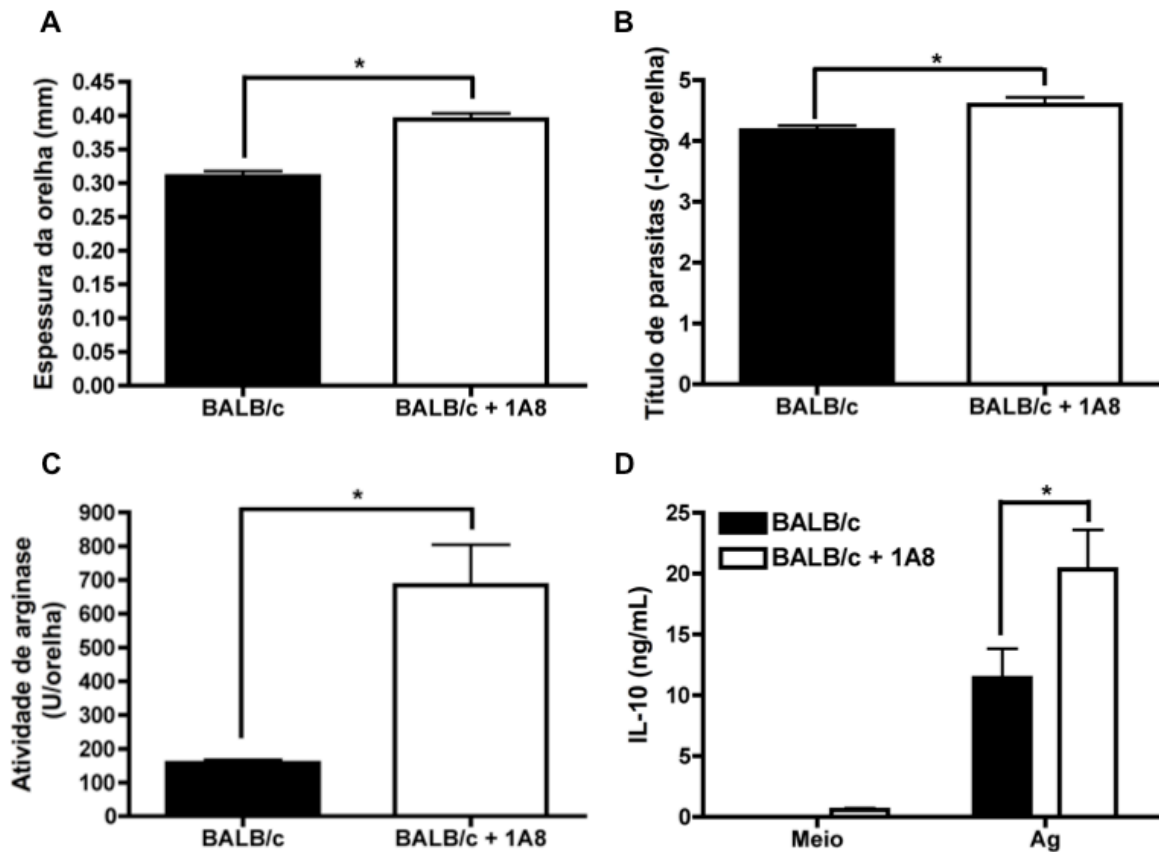


Gráfico 5: Tratamento com anticorpo monoclonal 1A8 produz resultados semelhantes ao tratamento com o anticorpo RB6-8C5. Camundongos BALB/c foram tratados com 1 mg do anticorpo 1A8 e dezesseis horas depois foram infectados na orelha com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Sete dias após a infecção, a espessura da orelha foi medida (A); em seguida, os camundongos foram eutanasiados e as orelhas foram coletadas para avaliação da carga de parasitas por diluição limitante (B) e da atividade de arginase (C); células dos linfonodos drenantes foram coletadas e estimuladas com antígeno de *L. amazonensis* (Ag). Após 72 horas, os sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem dos níveis de IL-10 por ELISA (D). Os dados representam média \pm erro padrão de 6 animais/grupo. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.6 – A depleção de neutrófilos resulta em um aumento nos títulos de IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania* no soro de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*

A produção de anticorpos tem um papel muito importante na resposta imune a *L. amazonensis*. A fim de determinar se a presença de neutrófilos no momento da infecção poderia interferir com a produção inicial de anticorpos específicos contra *L. amazonensis*, nós obtivemos o soro de camundongos BALB/c infectados suficientes ou deficientes de neutrófilos e medimos os níveis de IgG1 e IgG2a anti-*L. amazonensis*. Após sete dias de infecção, foi possível detectar tanto IgG1 quanto IgG2a anti-*L. amazonensis*. Os níveis de IgG2a foram maiores que os níveis de IgG1 e a proporção IgG2a/IgG1 foi de 11,04. Níveis mais elevados de IgG2a em relação a IgG1 correlacionaram com maiores níveis de IFN- γ em relação a IL-4 em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. A depleção de neutrófilos aumentou os títulos de ambas imunoglobulinas no soro (gráfico 6). A produção de imunoglobulinas não foi alterada no sentido de uma produção predominante de IgG1, porém a razão IgG2a/IgG1 reduziu-se bastante, de 11,04 para 1,53. Desta forma, a presença dos neutrófilos nos estágios iniciais da infecção parece controlar os níveis de ambas imunoglobulinas IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania*, especialmente IgG1, no soro de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.

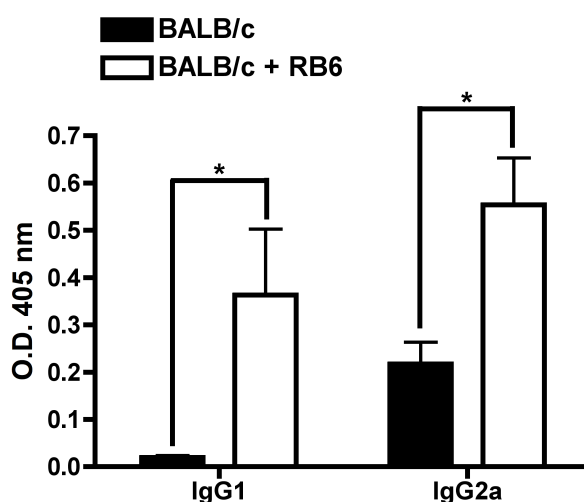


Gráfico 6: Níveis de IgG1 e IgG2a no soro de camundongos BALB/c infectados e depletados de neutrófilos. Camundongos BALB/c foram tratados com 500 μ g de RB6 e dezesseis horas depois foram infectados na orelha com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Sete dias depois, os camundongos foram anestesiados e o sangue foi coletado da veia femoral. Após centrifugação, o soro foi coletado e utilizado para detecção dos níveis de IgG1 e IgG2a por ELISA. Os dados representam média \pm erro padrão de 5-6 animais/grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.7 – A presença de neutrófilos no sítio de infecção modula o acúmulo de células T regulatórias

Visto que células T regulatórias têm o importante papel de restringir respostas patogênicas iniciais durante a infecção por *L. amazonensis* (Ji et al., 2005), nós resolvendo estudar o acúmulo de células T regulatórias no local da infecção na ausência ou na presença de neutrófilos. Nossos dados demonstraram que a depleção de neutrófilos alterou o acúmulo de células T regulatórias (células CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺, Tregs) nas orelhas infectadas sete dias após a infecção. As orelhas não infectadas apresentaram percentagens surpreendentemente altas de células Treg. Durante a infecção por *L. amazonensis*, houve uma queda significativa na percentagem destas células nas orelhas. Além disso, na ausência de neutrófilos houve uma redução ainda maior da percentagem de células T regulatórias (gráfico 7). Juntos, estes dados sugerem que a presença dos neutrófilos no momento da infecção é importante para a manutenção de níveis adequados de células T regulatórias, que por sua vez atuam restringindo respostas patogênicas nos estágios iniciais da infecção por *L. amazonensis*.

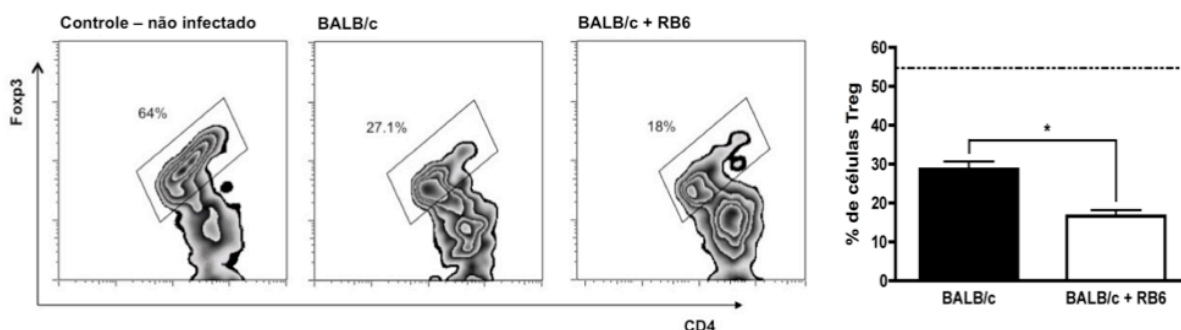


Gráfico 7: A depleção de neutrófilos altera a percentagem de células T regulatórias no local da infecção durante a primeira semana pós-infecção. Camundongos BALB/c foram tratados com 500 µg de RB6 e dezesseis horas depois foram infectados na orelha com 1×10^6 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Após sete dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados e as orelhas foram coletadas e processadas para imunofenotipagem por citometria de fluxo. O acúmulo de células T regulatórias nas orelhas infectadas é representado pela porcentagem de células CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺ dentro da população de células CD3⁺CD4⁺ na orelha, que representa 1 a 2% das células no sítio de infecção. A linha tracejada representa a porcentagem de células T regulatórias nas orelhas dos camundongos não infectados. Os dados representam média ± erro padrão de 5-6 animais/grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.8 – O aumento na produção de IL-10 induzido pela depleção de neutrófilos promove a proliferação do parasita, mas não a exacerbação da lesão

Neste trabalho nós demonstramos que a depleção de neutrófilos estava associada com desenvolvimento acelerado de lesões, aumento na atividade da enzima arginase e aumento na carga de parasitas. Estes eventos foram acompanhados por um aumento na secreção de IL-10 pelas células dos linfonodos re-estimuladas *in vitro* com antígeno de *L. amazonensis*. IL-10 é uma citocina associada à susceptibilidade a *Leishmania* (Kane & Mosser, 2001). Assim, os elevados níveis de IL-10 observados nos camundongos depletados de neutrófilos poderiam estar favorecendo a progressão da lesão e a proliferação do parasita. Além disso, visto que IL-10 é uma citocina indutora da atividade de arginase (Iniesta *et al.*, 2005), este poderia ser o mecanismo pelo qual a IL-10 poderia estar favorecendo o crescimento do parasita. Dessa forma, o nosso objetivo seguinte foi determinar se o aumento nos níveis de IL-10 observado em camundongos depletados de neutrófilos estaria promovendo a proliferação do parasita e o desenvolvimento de lesões. Para testar esta hipótese, nós tratamos camundongos depletados de neutrófilos com anti-IL-10R (500 µg) no dia da infecção e a cada três dias durante a primeira semana pós-infecção (gráfico 8). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com anti-IL-10R exacerbou ainda mais o desenvolvimento de lesões durante a primeira semana de infecção (gráfico 8A). Além disso, resultou em um aumento expressivo na atividade de arginase (gráfico 8C). Por outro lado, o bloqueio de IL-10 aboliu o aumento da carga de parasitas induzido pela depleção de neutrófilos (gráfico 8D). O tratamento com um anticorpo controle não relacionado (IgG de rato) não alterou a medida da lesão (gráfico 8B), a atividade de arginase (gráfico 8C) ou a carga de parasitas (gráfico 8E) após sete dias de infecção, indicando que os efeitos observados durante o tratamento de camundongos com anti-IL-10R se devem de fato ao bloqueio da sinalização via IL-10. Deste modo, nossos resultados sugerem que o aumento dos níveis de IL-10 nos camundongos depletados de neutrófilos promove a proliferação do parasita, no entanto este mecanismo parece ser independente da atividade da enzima arginase, já que a atividade de arginase foi ainda maior na ausência de IL-10. Por outro lado, nós observamos que a inibição de IL-10 levou a uma exacerbação do tamanho das lesões, sugerindo que IL-10 restringe o desenvolvimento inicial de lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.

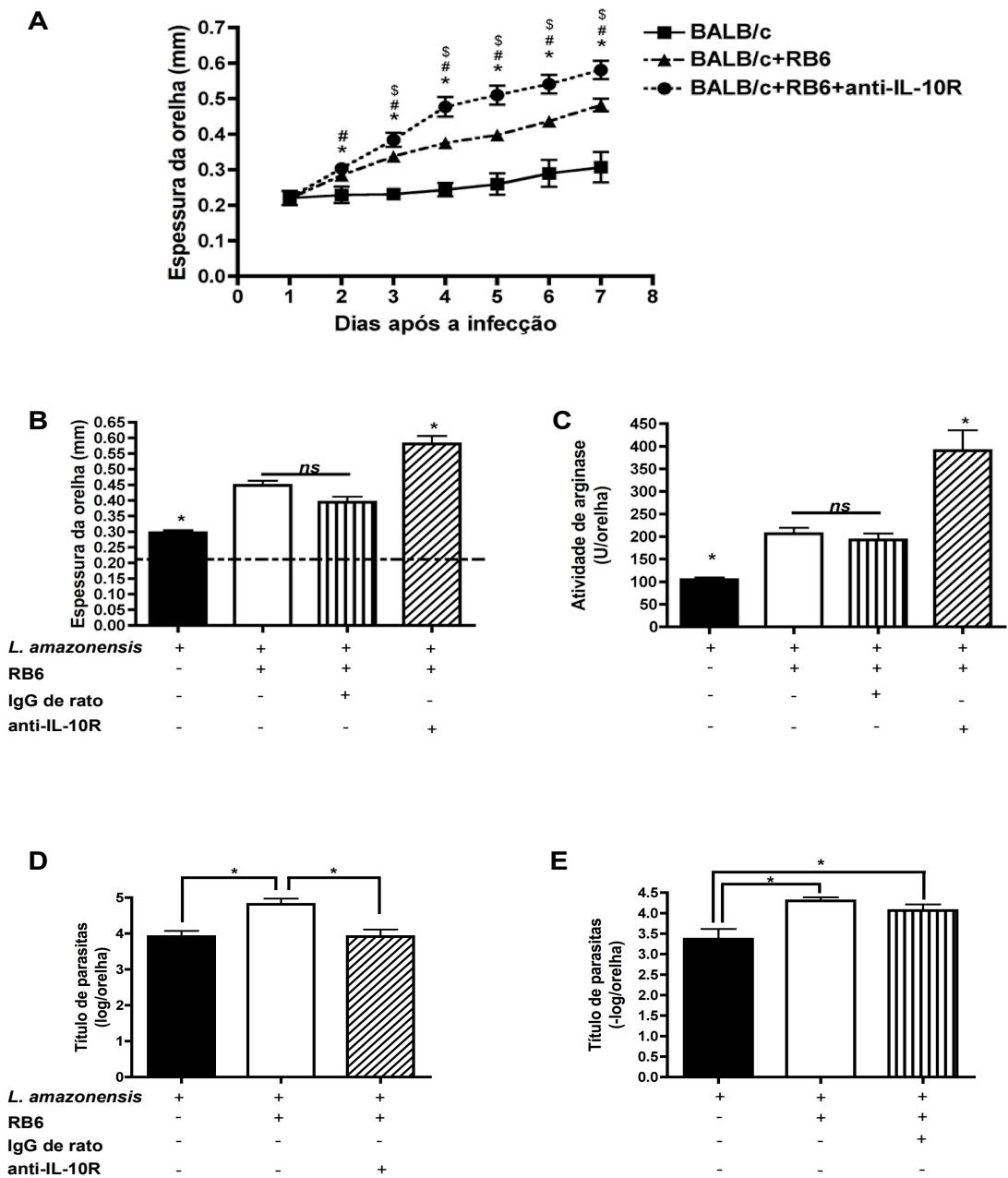


Gráfico 8: O bloqueio do receptor da citocina IL-10 em camundongos depletados de neutrófilos resulta em redução da carga de parasitas nas orelhas infectadas. Camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^6 formas metacíclicas de *L. amazonensis*. Os grupos tratados com RB6 receberam uma injeção i.p. (500 μ g) dezesseis horas após a infecção. Para inibição da sinalização via IL-10, camundongos foram inoculados por via i.p. a cada três dias com 500 μ g do anticorpo monoclonal anti-receptor da IL-10. Como controle, camundongos foram tratados da mesma maneira com 500 μ g de IgG de rato (**B**, **C** e **E**). A espessura da orelha foi monitorada diariamente (**A**). * indica $p < 0,001$ entre o grupo controle e o grupo tratado com RB6; # indica $p < 0,001$ entre o grupo controle e o grupo tratado com RB6 e anti-IL-10R; \$ indica $p < 0,05$ entre o grupo tratado com RB6 e o grupo tratado com RB6 e anti-IL-10R (análise de variância simples seguida do teste de Tukey). Em (**B**) está apresentada a espessura da orelha após uma semana de infecção. A atividade de arginase e a carga de parasitas são apresentadas em (**C**) e (**D** e **E**), respectivamente. Os dados representam média \pm erro padrão de 5-6 animais/grupo. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes. *ns* indica que não há diferença estatística entre o grupo tratado com RB6 e o grupo tratado com RB6 e soro de rato. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.9 – O aumento na produção de IL-10 em camundongos depletados de neutrófilos parece ser pelo menos parcialmente dependente do aumento nos níveis de IgG

Em nosso trabalho, o aumento nos níveis de IL-10 nos camundongos depletados de neutrófilos foi acompanhado por um aumento nos títulos de IgG1 e IgG2a anti-*Leishmania*. Estudos anteriores mostraram que imunocomplexos de IgG e *Leishmania* se ligam a receptores de Fc γ na superfície de macrófagos induzindo elevada produção de IL-10 (Lucas *et al.*, 2005). Para investigar se o aumento nos níveis de IgG estariam favorecendo a produção de IL-10, nós utilizamos duas estratégias. Primeiramente, nós realizamos um experimento *in vitro* com macrófagos derivados de medula óssea, no qual os macrófagos foram estimulados com LPS ou LPS e imunocomplexo (IC) e, em seguida, foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis*. Neste experimento, nós optamos por trabalhar com macrófagos uma vez que eles representam as principais células hospedeiras dos parasitas do gênero *Leishmania*, além disso, utilizamos formas promastigotas de *Leishmania*, visto que há evidências de que neutrófilos ao entrarem em apoptose podem liberar parasitas viáveis e móveis passíveis de serem fagocitados por macrófagos (Peters *et al.*, 2008). Conforme descrito na literatura, o tratamento com LPS + IC induziu um aumento nos níveis de IL-10 em relação ao tratamento com LPS apenas em macrófagos de camundongos não infectados (gráfico 9A). Para nossa surpresa, a infecção com *L. amazonensis* induziu uma produção ainda maior de IL-10 tanto nos macrófagos estimulados com LPS quanto nos tratados com LPS + IC. Nossos resultados sugerem que tanto a estimulação com imunocomplexos quanto a infecção com promastigotas de *L. amazonensis* são capazes de modular a produção de IL-10 em macrófagos estimulados com LPS, levando à secreção de altos níveis de IL-10 *in vitro*. Estes resultados indicam que a produção de IL-10 pode ser, pelo menos em parte, induzida pela estimulação com imunocomplexos. Para verificar se este também é o caso *in vivo*, nós bloqueamos a sinalização via receptor de Fc γ , ao qual os imunocomplexos se ligam. Para tal, os camundongos depletados de neutrófilos foram infectados e tratados com o anticorpo monoclonal 2.4G2, que se liga especificamente e com alta afinidade aos domínios extracelulares de Fc γ RII e Fc γ RIII. Já foi previamente demonstrado que ele bloqueia a eliminação *in vivo* de imunocomplexos. O tratamento com 2.4G2 inibiu o aumento na produção de IL-10 induzido pela depleção de neutrófilos (gráfico 9B). Assim, nossos resultados sugerem que o aumento nos níveis de IgG anti-*L. amazonensis* observado em

camundongos depletados de neutrófilos parece estar induzindo a produção de IL-10, que conforme demonstramos favorece a proliferação do parasita.

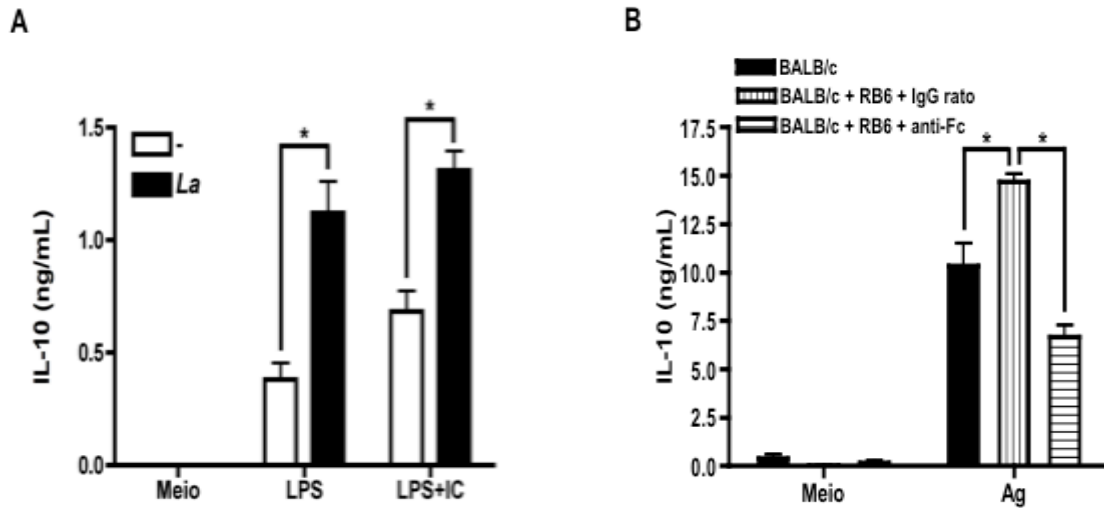


Gráfico 9: O aumento na produção de IL-10 em camundongos depletados de neutrófilos parece ser pelo menos parcialmente dependente do aumento nos níveis de IgG. Macrófagos derivados de medula óssea foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de cinco parasitas por macrófago na ausência ou na presença de LPS (10 ng/mL) ou LPS+IC. Após 24 horas, os sobrenadantes de cultura foram coletados e os níveis de IL-10 foram dosados por ELISA (A). Os dados representam média \pm erro padrão. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * indica $p < 0,01$ (teste de Mann-Whitney). Para o bloqueio do receptor $Fc\gamma$, os camundongos tratados com RB6 e infectados com *L. amazonensis* foram inoculados por via intraperitoneal com anticorpo monoclonal 2.4G2 ou com IgG de rato (200 μ g) nos dias 2, 4 e 6 após a infecção. Uma semana após a infecção, os camundongos foram eutanasiados e as células dos linfonodos drenantes foram coletadas e estimuladas com antígeno de *L. amazonensis* (Ag). Após 72 horas, os sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem dos níveis de IL-10 por ELISA (B). Os dados representam média \pm erro padrão de 6 animais/grupo. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.10 – Promastigotas de *L. amazonensis* induzem a produção de IL-10 e reprimem a secreção de IL-12 por macrófagos estimulados com LPS

Nossos dados apontam para um importante papel da IL-10 no favorecimento da sobrevivência ou proliferação de *L. amazonensis* nos estágios iniciais da infecção. Como vimos, os imunocomplexos parecem ter um papel na indução de IL-10 no nosso modelo. Porém, nossos resultados sugerem que não só os imunocomplexos têm um importante papel como indutores de IL-10, o próprio parasita foi capaz de estimular a produção de IL-10 em macrófagos estimulados com LPS. Assim, a fim de aprofundar os estudos nesta questão, nós estimulamos macrófagos com LPS e em seguida infectamos os macrófagos com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Após 8 horas de cultura, os sobrenadantes de cultura foram coletados para a dosagem de IL-10 e IL-12 por ELISA. A infecção de macrófagos estimulados com LPS induziu uma produção de altos níveis de IL-10 e uma potente supressão dos níveis de IL-12 quando comparado aos macrófagos não infectados (gráficos 10A e 10B). É interessante notar que na ausência do estímulo inflamatório, o parasita não foi capaz de induzir a produção de nenhuma das citocinas estudadas. Além disso, checamos a expressão do RNA mensageiro de IL-10 e observamos que a infecção de macrófagos não estimulados não resultou em aumento da expressão de IL-10 em relação a macrófagos não infectados e não estimulados, porém a infecção de macrófagos estimulados com LPS resultou em um aumento expressivo na expressão do mRNA de IL-10 (gráfico 10C). Dessa forma, nossos dados indicam que a infecção com promastigotas de *L. amazonensis* é capaz de modular a produção de citocinas induzidas por LPS, levando a produção de altos níveis de IL-10 e suprimindo a secreção de IL-12.

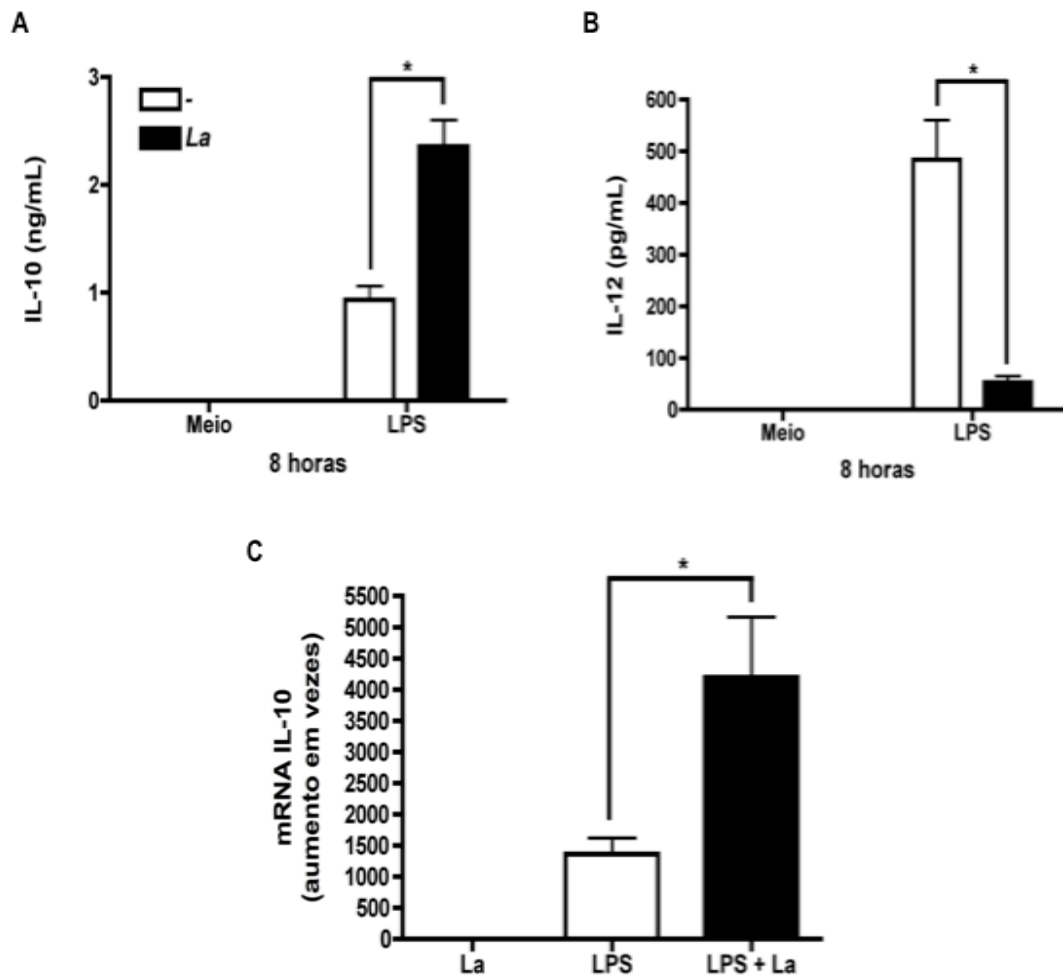


Gráfico 10: Formas promastigotas de *L. amazonensis* induzem a produção de IL-10 e inibem a produção de IL-12 por macrófagos de medula óssea estimulados com LPS. Macrófagos derivados de medula foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento na ausência ou na presença de LPS (10 ng/mL). A razão de parasitas por macrófago foi de 5:1. Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 8 horas para detecção dos níveis de IL-10 (**A**) e IL-12 (**B**) por ELISA. Os resultados representam a média de oito experimentos independentes realizados em triplicata. * indica $p < 0,001$ (teste de Mann-Whitney). Em **C**, os macrófagos foram cultivados como indicado anteriormente e após 5 horas de incubação, o RNA total foi extraído, transcrito em cDNA e foi realizada reação de RT-PCR em tempo real para detectar a presença do mRNA da citocina IL-10. O gene alvo foi normalizado utilizando um controle endógeno (GAPDH) e os valores apresentados representam o aumento em número de vezes em relação à expressão do gene de interesse por macrófagos não estimulados. Os resultados representam a média de cinco experimentos independentes realizados em triplicata. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.11 – Promastigotas de *L. amazonensis* também induzem a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com ácido hialurônico, um estímulo inflamatório presente no local da infecção

Nossos dados anteriores mostraram que a infecção por *L. amazonensis* é capaz de induzir a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS. Resolvemos testar, então, se outro estímulo inflamatório fisiologicamente importante seria capaz de induzir a produção de IL-10. Componentes da matriz extracelular são capazes de regular a ativação e a função de leucócitos nos sítios inflamatórios. Fragmentos de baixo peso molecular de ácido hialurônico se acumulam durante o processo inflamatório e já foi demonstrado que tais moléculas induzem a produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos derivados de medula óssea e macrófagos alveolares (Hodge-Dufour *et al.*, 1997). Dessa forma, estimulamos macrófagos derivados de medula com LPS ou ácido hialurônico (HA) e em seguida infectamos estas células com promastigotas de *L. amazonensis*. Nossos dados indicam que a infecção de macrófagos estimulados com HA também resulta na indução da produção de IL-10 e na inibição da secreção de IL-12 (gráficos 11A e 11B). Contudo, a estimulação com HA leva à produção de menores níveis de IL-10 e maiores níveis de IL-12, quando comparado à estimulação com LPS. Por esse motivo, em todos os nossos experimentos posteriores utilizamos LPS para estimular os macrófagos, uma vez que encontramos diferenças mais expressivas. No entanto, estes experimentos nos mostraram que na presença de um estímulo frequentemente encontrado nos tecidos inflamados, a infecção por promastigotas de *L. amazonensis* é capaz de induzir a produção de IL-10 por macrófagos, o que sugere que este efeito observado *in vitro* pode ter um papel relevante durante infecções naturais.

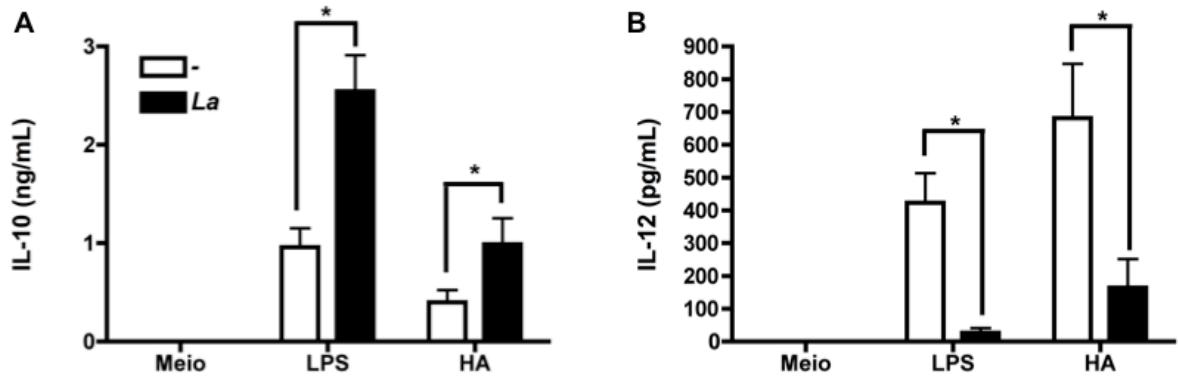


Gráfico 11: Promastigotas de *L. amazonensis* induzem produção de IL-10 por macrófagos estimulados com ácido hialurônico (HA). Macrófagos derivados de medula foram estimulados com LPS (10 ng/mL) ou HA (10 µg/mL) e em seguida foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento na razão de cinco parasitas por macrófagos. Para controle, os macrófagos foram cultivados apenas em meio. Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 8 horas para detecção dos níveis de IL-10 (A) e IL-12 (B) por ELISA. Os resultados representam a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.12 – Apenas formas promastigotas de *L. amazonensis* alteram as respostas de macrófagos ao estímulo com LPS

Estudos anteriores mostraram que formas amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de promover a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS ou HA apenas quando estão opsonizadas, formando imunocomplexos (Kane & Mosser, 2001). A fim de confirmar que apenas formas promastigotas de *L. amazonensis* são capazes de induzir a produção de IL-10, estimulamos macrófagos derivados de medula óssea com LPS e em seguida infectamos estas células com amastigotas axênicas ou promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis*. Nossos resultados confirmam os dados de literatura que mostram que amastigotas axênicas não são capazes de induzir a produção de IL-10 (gráfico 12A). Por outro lado, amastigotas foram capazes de inibir a produção de IL-12 (gráfico 12B). Assim, a infecção com ambas as formas de *L. amazonensis* é capaz de suprimir a produção de IL-12 por macrófagos estimulados com LPS, todavia apenas formas promastigotas são capazes de induzir a produção de IL-10 por estas células.

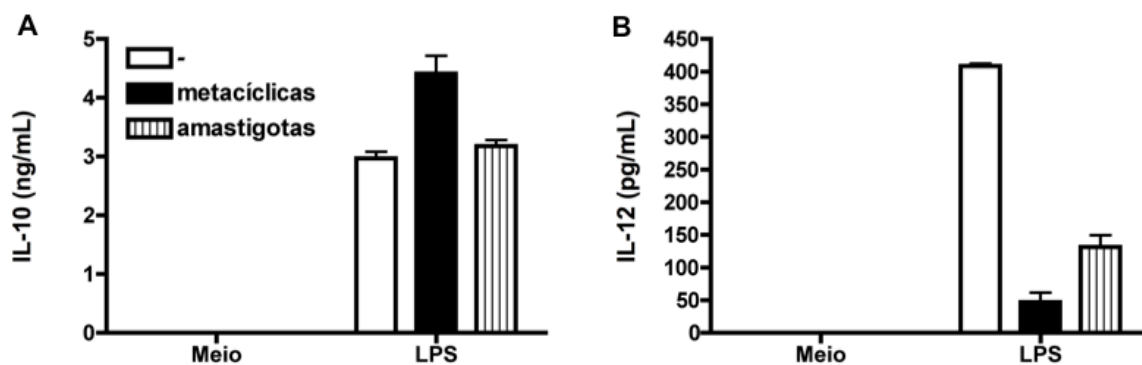


Gráfico 12: Apenas formas promastigotas de *L. amazonensis* induzem a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos derivados de medula foram estimulados com LPS (10 ng/mL) e em seguida foram infectados com formas amastigotas axênicas ou com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* na razão de 5 parasitas por macrófagos. Para controle, os macrófagos foram cultivados apenas em meio. Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas para detecção dos níveis de IL-10 (A) e IL-12 (B) por ELISA. Os dados representam média \pm erro padrão um experimento realizado em triplicata.

4.13 – Promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis* são capazes de reprimir a secreção de IL-12, mas não induzem a produção de altos níveis de IL-10

Nosso próximo objetivo foi avaliar se a indução da produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS era comum a diferentes espécies de *Leishmania* ou se era específica para *L. amazonensis*. Assim, nós infectamos macrófagos estimulados com LPS com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento das espécies: *L. amazonensis*, *L. major* e *L. braziliensis*. Cada uma destas espécies provoca diferentes respostas imunes e diferentes quadros clínicos. A infecção por *L. major* induziu um aumento discreto na produção de IL-10 ($p < 0,05$, em relação ao grupo apenas estimulado com LPS), porém este aumento foi significativamente menor do que aquele induzido pela infecção por *L. amazonensis* (gráfico 13A). Por outro lado, a infecção por *L. major* foi capaz de inibir a produção de IL-12, mas não aos mesmos níveis que a infecção por *L. amazonensis* (gráfico 13B). Com relação à infecção por *L. braziliensis*, não houve indução da produção de IL-10, apesar de ter havido supressão da produção de IL-12 (gráficos 13C e 13D). Assim, nossos dados indicam que a supressão da produção de IL-12 por macrófagos estimulados com LPS é comum às espécies de *Leishmania* estudadas, porém a indução da produção de altos níveis de IL-10 parece ser uma propriedade específica da espécie *L. amazonensis*.

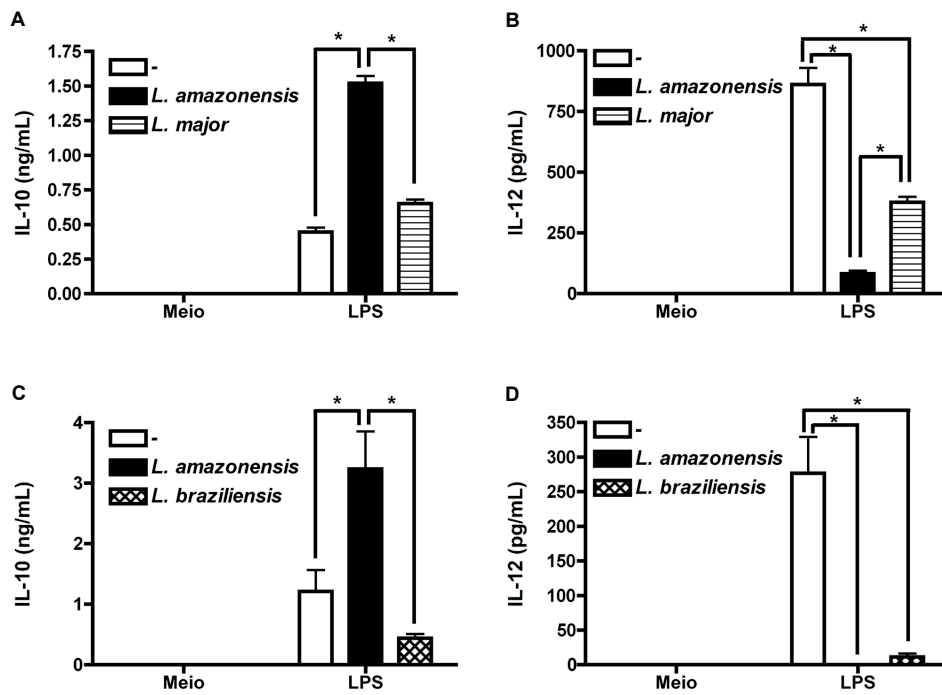


Gráfico 13: Promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis* são capazes de reprimir a secreção de IL-12, mas não induzem a produção de altos níveis de IL-10. Macrófagos derivados de medula foram cultivados na ausência de estímulo ou na presença de LPS (10 ng/mL) e em seguida foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major* ou *L. braziliensis* na razão de cinco parasitas por macrófago. Após 8 horas, os sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem de IL-10 (A e C) e IL-12 (B e D) por ELISA. Os dados representam a média de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata. * indica $p < 0,01$ (teste de Mann-Whitney).

4.14 – A produção de IL-10 endógena induzida pela infecção com promastigotas de *L. amazonensis* favorece a replicação do parasita no interior de suas células hospedeiras

Como vimos, formas promastigotas de *L. amazonensis* induzem a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS ou com HA, um componente da matriz extracelular, e, portanto, um estímulo fisiologicamente importante. Além disso, observamos que esta é uma propriedade específica de formas promastigotas, mais especificamente as da espécie *L. amazonensis*. Mas como a IL-10 poderia favorecer a sobrevivência ou a proliferação dos parasitas no interior do macrófago? IL-10 tem a capacidade de inibir a atividade citotóxica de macrófagos. Além disso, já foi demonstrado que o pré-tratamento com IL-10 exógeno tornou os macrófagos refratários a IFN- γ e isto preveniu a eliminação de *L. major* durante infecções de macrófagos *in vitro* (Kane & Mosser, 2001). Assim, nós levantamos a hipótese de que o parasita poderia estar subvertendo os mecanismos de resistência do hospedeiro por induzir a produção de IL-10 que atuaria de maneira endócrina desativando os macrófagos de forma que eles se tornassem incapazes de responder aos efeitos ativadores do IFN- γ . Para investigar tal hipótese, nós tratamos um grupo de macrófagos com IFN- γ antes e durante a estimulação com LPS e a infecção; um grupo foi infectado sem receber nenhum tratamento; outro grupo recebeu LPS imediatamente antes da infecção; e finalmente o último grupo recebeu LPS no momento da infecção e três horas depois foi estimulado com IFN- γ (gráfico 14A). Após 2 horas de infecção, todas as lamínulas foram lavadas para remover os parasitas não internalizados e os estímulos foram adicionados novamente. As lamínulas obtidas após 2 horas de infecção serviram como controle para garantir que houve o mesmo grau de internalização de promastigotas entre os grupos. O grupo controle tratado com IFN- γ antes e durante a estimulação e a infecção funcionou como esperado, resultando na eliminação quase que completa do parasita. Porém, ao contrário do que esperávamos, o tratamento com IFN- γ três horas após o estímulo com LPS e a infecção ainda foi capaz de controlar o número de parasitas. Nossa hipótese inicial parecia estar incorreta. No entanto, nos deparamos com um resultado bastante interessante. O tratamento com LPS no momento da infecção favoreceu a replicação do parasita. O número de parasitas por macrófago foi bem maior nos macrófagos tratados com LPS em relação aos macrófagos não estimulados. Este resultado nos levou a uma outra hipótese: talvez a produção de IL-10 induzida pelo parasita não estivesse desativando estes macrófagos, mas estivesse, na verdade, favorecendo a replicação destes parasitas no interior de suas células hospedeiras. Para verificar esta nova hipótese, tratamos

macrófagos com LPS e anti-IL-10 e em seguida infectamos estas células com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (gráfico 14B). Como controle, utilizamos macrófagos não estimulados e infectados; e macrófagos estimulados com LPS e infectados. De fato, o tratamento com anti-IL-10 aboliu o aumento da carga de parasitas induzido pelo LPS, indicando que era a IL-10 produzida em resposta à infecção que estava favorecendo a proliferação do parasita.

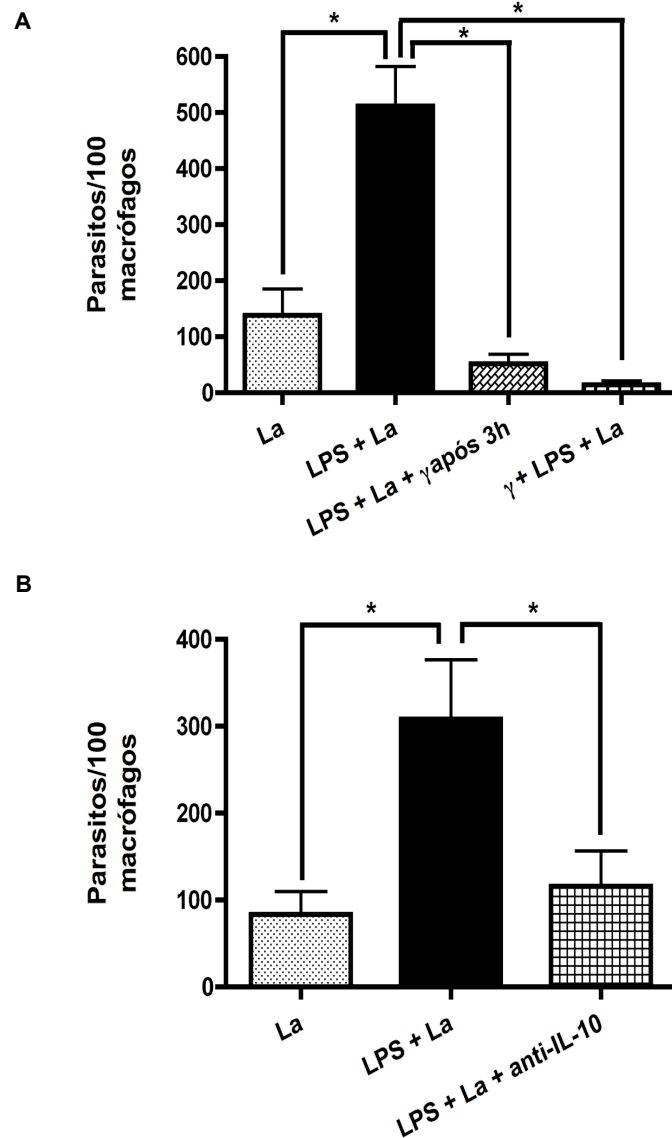


Gráfico 14: O aumento da produção de IL-10 induzido pelo parasita favorece a proliferação do mesmo. (A) Promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* foram adicionadas a monocamadas de macrófagos que foram cultivadas: na presença meio de cultura, apenas; na presença de LPS (10 ng/mL); na presença de LPS (10 ng/mL) e 3 horas depois receberam IFN- γ (100 U/mL); na presença de LPS (10 ng/mL) e IFN- γ (100 U/mL). Após 72 horas, as monocamadas de macrófagos foram fixadas em metanol e coradas para imunofluorescência. Os parasitas foram corados com FITC e os núcleos dos macrófagos foram corados com DAPI. O experimento foi realizado em triplicata e 200 macrófagos por lamínula foram contados. Os dados representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney). (B) Promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* foram adicionadas na proporção de 10 parasitas por macrófago na presença de: meio de cultura apenas; LPS (10 ng/mL); LPS (10 ng/mL) + anti-IL-10 (20 μ g/mL). Após 72 horas, as células receberam o mesmo tratamento descrito em A. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.15 – A produção endógena de IL-10 não controla os níveis de IL-12 nem a expressão de iNOS por macrófagos estimulados com LPS e infectados com *L. amazonensis*

Estudos anteriores demonstraram que a citocina IL-10 controla os níveis de IL-12, TNF- α e iNOS em macrófagos (Berlato *et al.*, 2002; Bogdan *et al.*, 1991; Lang *et al.*, 2002). O tratamento com IL-10 resultou em inibição da produção de óxido nítrico e em redução da capacidade de eliminação dos parasitas em macrófagos infectados com *Toxoplasma gondii* ou *Schistosoma mansoni* (Gazzinelli *et al.*, 1992). Em um outro trabalho, foi demonstrado que a expressão constitutiva de IL-10 em macrófagos resultou em supressão da expressão de TNF- α e IL-12 durante a estimulação com LPS. Assim, na tentativa de explicar como a produção de IL-10 favorece a multiplicação do parasita, nós tratamos os macrófagos estimulados com LPS e infectados com *L. amazonensis* com anti-IL-10 e avaliamos a produção de TNF- α e IL-12 e a expressão de iNOS. Primeiramente, observamos que a IL-10 endógena controla os níveis de TNF- α e IL-12 produzidos em macrófagos estimulados com LPS (gráficos 15A e 15B). Porém, o bloqueio de IL-10 em macrófagos infectados resulta em um pequeno aumento nos níveis de TNF- α , mas não altera os níveis de IL-12. Estes dados indicam que a supressão da produção de IL-12 parece não ter relação com aumento nos níveis de IL-10, visto que mesmo na ausência de IL-10, a infecção por *L. amazonensis* foi capaz de induzir supressão da produção de IL-12. Com relação à expressão de iNOS, a infecção com *L. amazonensis* inibiu fortemente a expressão de iNOS induzida por LPS (gráfico 15C). Não foi possível detectar a expressão de iNOS em macrófagos infectados e não estimulados, de modo que macrófagos infectados e estimulados apresentaram maior expressão de iNOS, apesar de terem apresentado um maior número de parasitas em relação aos macrófagos não estimulados. Além disso, o tratamento com anti-IL-10 não provocou aumento na expressão de iNOS. Assim, a IL-10 endógena teve papéis diferentes na ausência e na presença do parasita. Na ausência do parasita, a IL-10 endógena parece controlar tanto os níveis de TNF- α quanto os de IL-12 induzidos por LPS. No entanto, nossos resultados indicam que a IL-10 endógena produzida em resposta à infecção não controla os níveis de TNF- α e IL-12 nem a expressão de iNOS.

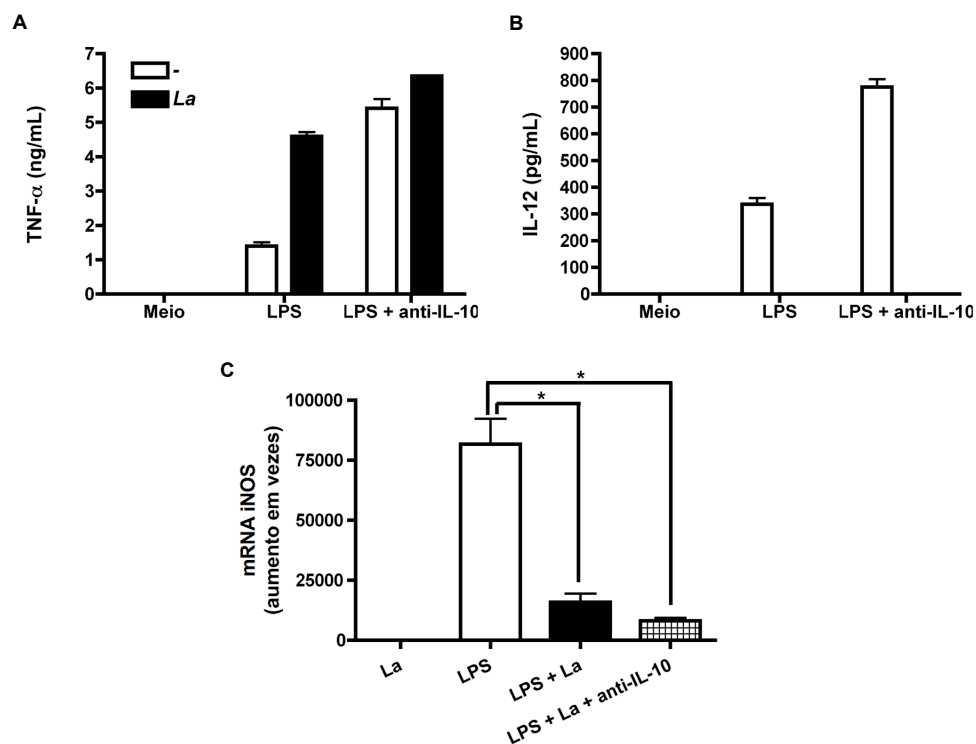


Gráfico 15: Efeito do bloqueio de IL-10 sobre a produção de TNF- α e IL-12 e sobre a expressão de iNOS. Macrófagos derivados de medula óssea foram cultivados nas seguintes condições: apenas em meio de cultura; na presença de LPS (10 ng/mL); LPS (10 ng/mL) + anti-IL-10 (20 μ g/mL). Promastigotas de *L. amazonensis* foram adicionadas na proporção de 5 parasitas por macrófago. Após 8 horas de infecção, os sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem de TNF- α (A) e IL-12 (B) por ELISA. Em C, macrófagos foram cultivados como descrito acima e após 5 horas de incubação, o RNA total foi extraído, transcrito em cDNA e foi realizada reação de RT-PCR em tempo real para detectar a presença do mRNA da enzima iNOS. O gene alvo foi normalizado utilizando um controle endógeno (GAPDH) e os valores apresentados representam o aumento em número de vezes em relação à expressão do gene de interesse por macrófagos não estimulados. Os dados representam média \pm erro padrão de um experimento realizado em triplicata.

4.16 – A proliferação do parasita induzida por IL-10 não parece estar relacionada com indução da atividade de arginase ou com repressão da atividade de iNOS

Arginase I e iNOS são enzimas envolvidas no metabolismo de L-arginina nos macrófagos, porém têm efeitos opostos. A atividade de arginase é induzida por IL-4, IL-10 e TGF- β . A ativação da enzima arginase leva a produção de poliaminas, que favorecem a replicação de *L. major* no interior dos macrófagos. Por outro lado, a expressão de iNOS é induzida por IFN- γ e favorece a eliminação do parasita e, assim, a resistência à infecção. Dessa forma, o favorecimento da proliferação do parasita poderia ser resultado de um aumento da atividade de arginase, de uma redução da produção de óxido nítrico ou de ambos. Nosso próximo objetivo foi comparar a atividade de arginase e a produção de óxido nítrico entre os seguintes grupos: macrófagos não estimulados; macrófagos não estimulados e infectados com *L. amazonensis*; macrófagos estimulados com LPS e macrófagos estimulados com LPS e infectados. Nossos dados indicam que na presença de LPS houve um aumento tanto na atividade de arginase quanto na produção de óxido nítrico (gráficos 16A e 16B). Porém, os níveis de produção de óxido nítrico por nós encontrados foram extremamente baixos. Por outro lado, a infecção com *L. amazonensis* não alterou a atividade de arginase ou a produção de óxido nítrico. Assim, o aumento da secreção de IL-10 induzido pela infecção por *L. amazonensis* não foi associado à modulação da atividade das enzimas arginase e iNOS. Dessa forma, a proliferação do parasita induzida por IL-10 não parece estar relacionada com indução da atividade de arginase ou com repressão da atividade de iNOS.

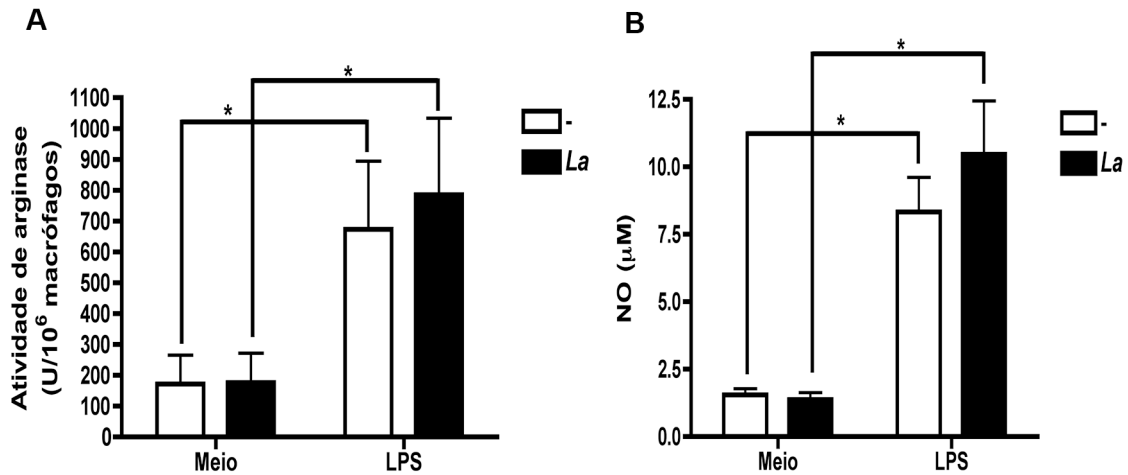


Gráfico 16: A infecção de macrófagos estimulados com LPS não altera a atividade das enzimas arginase e iNOS. Macrófagos derivados de medula foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento na ausência ou na presença de LPS (10 ng/mL). A razão de parasitas para macrófagos foi de 5:1. Após 24 horas de infecção, as monocamadas de macrófagos foram lisadas para realização de ensaio atividade de arginase (A), enquanto os sobrenadantes de cultura foram coletados para realização de ensaio de Griess (B). Os resultados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. * indica $p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

4.17 – A produção de IL-10 induzida pelo parasita parece ser dependente da sinalização via MAP/ERK quinase

Nosso próximo objetivo foi estudar a via de sinalização envolvida na produção de IL-10 induzida pela infecção com promastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos estimulados com LPS. Já foi demonstrado que a ligação de imunocomplexos de IgG-*Leishmania* em receptores de Fc γ na superfície dos macrófagos induz a ativação de ERK, que leva à produção de IL-10 (Yang *et al.*, 2007). Com base neste estudo, nós levantamos a hipótese de que a ativação de ERK também estivesse envolvida na indução de IL-10 no nosso modelo. Para verificar se nossa hipótese era verdadeira, os macrófagos foram tratados com U0126, um composto que inibe a ativação da via das MAP quinases (ERK 1/2) pela inibição seletiva da atividade de MEK1 e MEK2, simultaneamente ao tratamento com LPS e à infecção. O tratamento com U0126 resultou em inibição parcial da produção de IL-10 tanto em macrófagos infectados quanto nos não infectados. Assim, tanto a produção de IL-10 induzida por LPS quanto aquela potencializada pela infecção parecem ser parcialmente dependentes da via de sinalização MAP/ERK quinase (gráfico 17A). Somam-se a estes dados os resultados que mostram que expressão do mRNA de IL-10 também sofreu uma expressiva inibição quando a via das ERK quinases foi inibida (gráfico 17C). Estes dados indicam que o bloqueio da sinalização via ERK inibiu tanto a expressão quanto a secreção de IL-10. Por outro lado, a inibição de MEK1/2 não alterou a produção de IL-12 por macrófagos infectados, mas aumentou a secreção de IL-12 por macrófagos não infectados estimulados com LPS (gráfico 17B). Portanto, a ativação de ERK 1/2 parece controlar os níveis de IL-12 em macrófagos estimulados com LPS, porém não parece estar envolvida na inibição da secreção de IL-12 induzida pela infecção com o parasita. Uma vez que a sinalização via ERK parece ser importante para a produção de IL-10 no nosso modelo, nós verificamos se o tratamento com U0126 reverteria o aumento da proliferação do parasita no interior dos macrófagos em resposta a produção de IL-10 induzida pelo próprio parasita. Nossos resultados mostram que de fato a inibição da via de sinalização das ERK quinases aboliu o aumento da carga de parasitas em macrófagos estimulados com LPS.

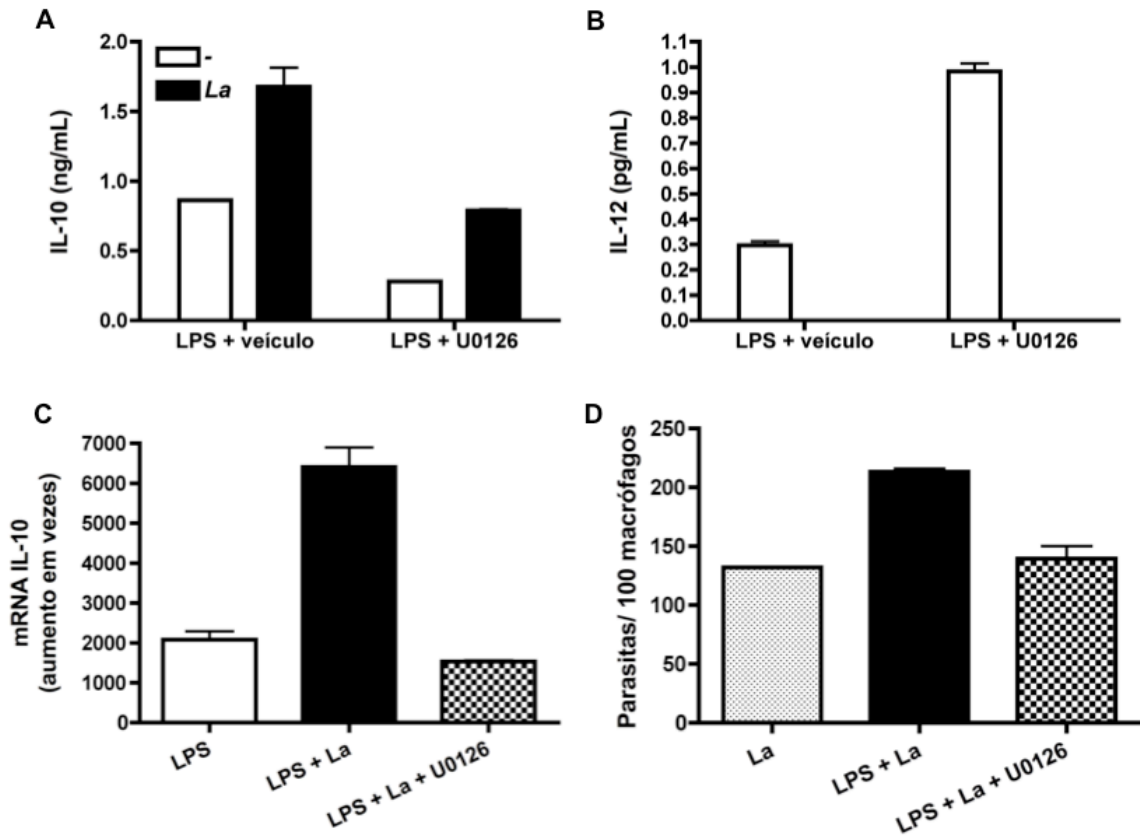


Gráfico 17: A produção de IL-10 induzida pelo parasita parece ser dependente da sinalização via MAP/ERK quinase. (A e B) Monocamadas de macrófagos foram tratadas com LPS (10 ng/mL) na presença de U0126 (1 μ M) ou do veículo da droga (DMSO). Os grupos infectados receberam promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de cinco parasitas por macrófagos. Após 8 horas, os sobrenadantes de cultura foram coletados para dosagem de IL-10 (A) e IL-12 (B). Em C, macrófagos foram cultivados como descrito acima e após 5 horas de incubação, o RNA total foi extraído, transcrito em cDNA e foi realizada reação de RT-PCR em tempo real para detectar a presença do mRNA da citocina IL-10. Em D, promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* foram adicionadas a monocamadas de macrófagos que foram cultivadas: na presença meio de cultura, apenas; na presença de LPS (10 ng/mL); na presença de LPS (10 ng/mL) e U0126 (1 μ M). Após 72 horas, as monocamadas de macrófagos foram fixadas em metanol e coradas para imunofluorescência. Os parasitas foram corados com FITC e os núcleos dos macrófagos foram corados com DAPI. O experimento foi realizado em triplicata e 200 macrófagos por lamínula foram contados. Os dados representam média \pm erro padrão um experimento realizado em triplicata.

5 – DISCUSSÃO

Neste trabalho nós demonstramos que neutrófilos apresentam um papel protetor durante estágios iniciais de infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, controlando tanto a carga de parasitas quanto o desenvolvimento de lesões. Neutrófilos representam a primeira linha de defesa contra infecções e já foi demonstrado o papel destas células na resistência a infecções por bactérias como *Listeria monocytogenes* (Appelberg *et al.*, 1994) e *Mycobacterium tuberculosis* (Pedrosa *et al.*, 2000); por fungos como *Candida albicans* (Romani *et al.*, 1997) e por protozoários como *Toxoplasma gondii* (Bennouna *et al.*, 2003) e alguma espécie de *Leishmania* (Chen *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 1998; McFarlane *et al.*, 2008; Novais *et al.*, 2009; Rousseau *et al.*, 2001). Durante infecções por *L. braziliensis*, a depleção de neutrófilos aumentou a proliferação do parasita, enquanto a inoculação simultânea de neutrófilos e parasitas favoreceu a morte do parasita (Novais *et al.*, 2009). Nas infecções por *L. infantum*, neutrófilos contribuíram para a eliminação dos parasitas (Rousseau *et al.*, 2001). Além disso, neutrófilos apresentaram um papel crítico na resposta imune inicial a *L. donovani*, atuando tanto na eliminação do parasita quanto no desenvolvimento da resposta imune adaptativa, promovendo o desenvolvimento de respostas Th1 (McFarlane *et al.*, 2008). Não obstante, o papel dos neutrófilos durante as infecções por *L. major*, que representam o modelo de infecção por *Leishmania* mais bem estudado, ainda é controverso. Estudos *in vitro* demonstraram que neutrófilos são capazes de fagocitar promastigotas de *L. major* e que alguns parasitas são capazes de sobreviver dentro destas células. Neutrófilos são células de vida curta, que quando entram em apoptose são internalizados por macrófagos. A fagocitose de neutrófilos apoptóticos evita a ativação dos macrófagos, permitindo a entrada silenciosa de parasitas viáveis dentro dos macrófagos. Com base nestes estudos *in vitro*, foi proposta a hipótese de que neutrófilos serviriam como cavalos de Troia por meio dos quais promastigotas de *L. major* seriam capazes de entrar de maneira silenciosa em suas células hospedeiras definitivas, os macrófagos (van Zandbergen *et al.*, 2004). De fato, alguns estudos de infecção *in vivo* por *L. major* corroboram esta hipótese pela demonstração de que a depleção de neutrófilos reduziu o número de parasitas viáveis no sítio de infecção (Peters *et al.*, 2008) e controlou o desenvolvimento de lesões (Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). No entanto, em outros estudos a depleção de neutrófilos em camundongos BALB/c infectados com *L. major* levou à exacerbação de lesões e ao aumento na carga de parasitas, contrariando a hipótese do cavalo de Troia (Chen *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 1998). O uso de diferentes

linhagens de camundongos, distintas espécies e cepas de *Leishmania* e diferentes sítios de infecção pode explicar as discrepâncias encontradas no estudo do papel dos neutrófilos nas infecções por *Leishmania*. Desse modo, podemos dizer que o papel dos neutrófilos vai depender das características do microambiente onde a infecção se processa (neste caso, deve-se levar em conta o fundo genético do hospedeiro e o local da infecção) e das características do parasita.

Neutrófilos são as primeiras células a migrar massivamente para o local da infecção por *Leishmania* (Peters et al., 2008). Estudos anteriores sugeriram que o dano tecidual causado pela picada do flebótomo ou pela introdução da agulha era suficiente para induzir o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (Peters et al., 2008). Todavia, nós demonstramos que o dano estéril às orelhas não induziu o acúmulo de neutrófilos 24 horas após a infecção; a inoculação dos parasitas era requerida para manter uma intensa infiltração de neutrófilos. De fato, foi demonstrado recentemente que a infiltração inicial de neutrófilos foi induzida pelo menos em parte pelo dano tecidual causado pela agulha, porém em tempos subsequentes a presença do parasita era necessária para manter o recrutamento de neutrófilos (Ribeiro-Gomes et al., 2012). Em nosso estudo, nós observamos acúmulo de neutrófilos no local da infecção seis horas após a inoculação dos parasitas e o pico de acúmulo de neutrófilos ocorreu entre 6 e 24 horas. Após 72 horas, houve uma redução drástica do número de neutrófilos no local da infecção. É interessante destacarmos que, apesar de neutrófilos terem papéis distintos em resposta a diferentes espécies de *Leishmania*, nós encontramos uma cinética de migração de neutrófilos para as orelhas em resposta a *L. amazonensis* semelhante àquela observada em resposta a *L. major* (Ribeiro-Gomes et al., 2012) e *L. donovani* (Thalhofer et al., 2011).

Em nosso estudo, utilizamos o anticorpo monoclonal RB6-8C5 para depletar neutrófilos. Embora este anticorpo tenha sido bastante utilizado para depletar neutrófilos, há um grande debate no que diz respeito à especificidade deste anticorpo. RB6 se liga com alta afinidade a Ly6G, que é uma molécula expressa primariamente em granulócitos (Fleming et al., 1993), e se liga com baixa afinidade a Ly6C, que é expressa em altos níveis em monócitos de medula óssea e em níveis intermediários em neutrófilos de medula (de Bruijn et al., 1994; Nikolic et al., 2003). Já foi demonstrado que o tratamento com RB6 depleta não apenas neutrófilos, mas também monócitos Ly6C⁺, enquanto o tratamento com o anticorpo monoclonal 1A8, que é reativo apenas contra Ly6G, depleta especificamente neutrófilos (Daley et al., 2008). No entanto, em outro estudo foi demonstrado que não há reatividade cruzada entre Ly6G e Ly6C (Nagendra & Schlueter, 2004). Neste trabalho, o anticorpo RB6

não se ligou a células Ly6C⁺ que são negativas para Ly6G, como esplenócitos CD8⁺, tímicos CD8⁺ e tímicos duplo negativos das linhagens de camundongo Ly-6.1 e Ly-6.2. Isto indica que células de medula óssea que são marcadas com anticorpo monoclonal RB6, expressam Ly-6G e Ly-6C como moléculas independentes. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com RB6 induz depleção de neutrófilos por apoptose e não resultou em depleção em células da medula óssea, provavelmente devido ao fato de que células de medula óssea expressam altos níveis de Mcl-1, um fator anti-apoptótico, que inibe a apoptose induzida pelo anticorpo (Ribechini *et al.*, 2009). Em nosso modelo de infecção nós demonstramos que o tratamento com ambos os anticorpos produziu exacerbação das lesões, aumento da carga de parasitas e da atividade de arginase e elevação dos níveis de IL-10 produzidos por células de linfonodo obtidas de camundongos BALB/c infectadas com *L. amazonensis*. De modo semelhante, Soehnlein e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento com o anticorpo RB6 ou com o 1A8 produziu resultados similares. Além disso, eles observaram que o tratamento com RB6 não afetou o número de monócitos circulantes e que o padrão de extravasamento de monócitos foi idêntico àquele encontrado quando o anticorpo 1A8 foi utilizado (Soehnlein *et al.*, 2008). As pequenas diferenças observadas entre os tratamentos com os anticorpos RB6 ou 1A8 podem ser um resultado das diferentes eficiências dos anticorpos. Enquanto o anticorpo RB6 depleta 99% dos neutrófilos, o anticorpo 1A8 depleta 85% dos neutrófilos. Ainda resta a possibilidade de que parte do efeito do anticorpo RB6 se deva à depleção de monócitos Ly6C⁺. No entanto, nós acreditamos que os eventos observados em nosso estudo estão associados com a depleção específica de neutrófilos e que é pouco provável que estejam relacionados com a depleção de outra população de células que expressa Ly6C.

A depleção de neutrófilos alterou significativamente os estágios iniciais de infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c. Na presença de neutrófilos, praticamente não houve desenvolvimento de lesão durante a primeira semana de infecção. No entanto, quando neutrófilos foram depletados, nós observamos um aumento na espessura da orelha em comparação com os camundongos suficientes de neutrófilos já no segundo dia pós-infecção. Após uma semana, foi possível ver lesões bem definidas nos camundongos depletados. Tais lesões apresentavam quase o dobro da espessura das orelhas de camundongos não depletados. Contudo, tal aumento de susceptibilidade observado nos camundongos depletados de neutrófilos foi transiente, visto que o curso final da infecção não foi alterado. No entanto quando nós depletamos neutrófilos durante toda a primeira semana de infecção, nós encontramos efeitos mais dramáticos no curso da infecção: o aumento na espessura das lesões

estendeu-se até a oitava semana pós-infecção. Além de um acelerado desenvolvimento de lesões, a depleção de neutrófilos resultou em um aumento de dez vezes na carga de parasitas nas orelhas e nos linfonodos drenantes da lesão. Esses dados, em conjunto, sugerem que neutrófilos têm um papel protetor participando tanto no controle do número de parasitas quanto no desenvolvimento de lesões durante os estágios iniciais da infecção de camundongos BALB/c por *L. amazonensis*. De fato, já foi demonstrado que neutrófilos são capazes de eliminar eficientemente promastigotas de *L. amazonensis in vitro* tanto por fagocitose seguida de produção de espécies reativas de oxigênio (Carlsen *et al.*, 2013) quanto por liberação de NETs (Guimaraes-Costa *et al.*, 2009). A fagocitose e a morte de parasitas do gênero *Leishmania* por neutrófilos também foi demonstrada *in vivo*. Neutrófilos contendo um ou mais parasitas em vários graus de degradação foram detectados durante os estágios iniciais de infecção por *L. infantum* (Rousseau *et al.*, 2001) e por *L. major* (Lima *et al.*, 1998). Além disso, durante a infecção por *L. infantum* os neutrófilos eram as células que continham a maior proporção de parasitas intracelulares entre 6 e 24 horas e a depleção de neutrófilos tornou mais lenta a eliminação de promastigotas extracelulares (Thalhofer *et al.*, 2011). Ademais, neutrófilos têm sido implicados na eliminação de *L. amazonensis in vivo*: a deficiência no receptor de IFN do tipo I resultou em uma infiltração persistente de neutrófilos no local da infecção, a qual foi associada com uma maior eliminação do parasita (Xin *et al.*, 2010).

Apesar de termos demonstrado que a depleção de neutrófilos aumentou a susceptibilidade a infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c durante os estágios iniciais de infecção, ela não foi capaz de alterar o curso da infecção em camundongos C57BL/6 em nenhum dos tempos estudados. Diferenças no envolvimento de neutrófilos durante a infecção por *Leishmania* em camundongos BALB/c e C57BL/6 já foram descritas anteriormente (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Uma série de razões pode provocar tais diferenças. Primeiro, o número de neutrófilos nas lesões é bem maior em camundongos BALB/c em comparação com camundongos C57BL/6 (Gráfico 1). Além disso, em camundongos BALB/c neutrófilos representam aproximadamente 90% das células que infiltram a lesão, enquanto que em camundongos C57BL/6 eles compõem apenas 50% das células (Beil *et al.*, 1992). Soma-se a isto o fato de os macrófagos de camundongos BALB/c serem menos potentes na indução da apoptose de neutrófilos, um processo essencial para a eliminação de neutrófilos do sítio de infecção, do que macrófagos de camundongos C57BL/6 (Allenbach *et al.*, 2006). Os neutrófilos não só estão presentes em diferentes quantidades, como também o parasita é capaz de induzir fenótipos diferentes em neutrófilos

de camundongos BALB/c e C57BL/6 (Charmoy *et al.*, 2007). Finalmente, a ausência de efeito da depleção de neutrófilos mediada por anticorpo em camundongos C57BL/6 pode estar relacionada com o fato de que esta linhagem de camundongo apresenta outros mecanismos de resistência capazes de superar a ausência de mecanismos de resistência dependentes de neutrófilos, como uma maior atividade de células NK (Scharton & Scott, 1993; Vester *et al.*, 1999) e uma migração antecipada de macrófagos ativados em comparação com camundongos BALB/c (Sunderkotter *et al.*, 1993).

Altos níveis de IL-17 foram produzidos por células de linfonodo obtidas de camundongos depletados de neutrófilos três dias após a infecção. Nos estágios iniciais do processo inflamatório, células Th17 naturais produzem IL-17, que é capaz de regular as funções dos neutrófilos (Marks *et al.*, 2009). O controle da produção de IL-17 também envolve neutrófilos: a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos inibe a expressão de IL-17 (Stark *et al.*, 2005). Na ausência de neutrófilos, macrófagos continuam a expressar IL-23, que promove a expressão de IL-17 e, como consequência, há um aumento da granulopoiese até que os neutrófilos atinjam os tecidos periféricos, e a expressão de IL-17 seja inibida. Assim, é possível que o aumento da secreção de IL-17 por células dos linfonodos ocorra meramente devido à ausência de neutrófilos, de modo que não há o controle negativo da expressão de IL-17. Dessa forma, a expressão de IL-17 fica descontrolada até que haja número suficiente de neutrófilos para inibir a produção de IL-17. É válido destacarmos que após sete dias de infecção não havia mais diferença na produção de IL-17 entre linfócitos de camundongos deficientes e suficientes de neutrófilos.

IL-10 está envolvida na susceptibilidade a diferentes espécies de *Leishmania* (Kane & Mosser, 2001; Murphy *et al.*, 2001a). Nas infecções por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, apesar de a citocina IL-10 contribuir para a imunopatogênese, ela não é o mediador dominante da susceptibilidade. A resolução completa da infecção requer a neutralização de IL-10 e IL-4 (Padigel *et al.*, 2003). É interessante notar que nestes trabalhos o bloqueio da IL-10 tem pouco efeito sobre o desenvolvimento de lesões, mas afeta profundamente a carga parasitária. Na ausência da IL-10 o número de parasita chega a ser mil vezes menor (Jones *et al.*, 2002; Padigel *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, nós observamos um aumento nos níveis de IL-10 associado com uma maior carga de parasitas em camundongos deficientes de neutrófilos. Usando o anticorpo monoclonal contra o receptor da IL-10 para o bloqueio da sinalização via IL-10, nós mostramos que o aumento nos números de parasitas observado em camundongos depletados de neutrófilos foi dependente da sinalização por IL-10. Dessa forma, acreditamos que o aumento de IL-10 favoreceu a sobrevivência ou a proliferação do

parasita. Uma vez que IL-10 é uma das principais citocinas envolvidas na indução da atividade de arginase, nós criamos a hipótese que IL-10 poderia estar favorecendo a proliferação do parasita por indução da atividade da enzima arginase I. Arginase I é uma enzima envolvida na síntese de poliaminas, que representam um importante nutriente utilizado diretamente por parasitas do gênero *Leishmania*. A indução de arginase I em macrófagos dá suporte ao crescimento do parasita (Iniesta *et al.*, 2005). Camundongos depletados de neutrófilos apresentaram uma carga de parasitas aumentada, associada a níveis elevados de IL-10 e atividade aumentada de arginase. No entanto, o bloqueio de IL-10R resultou em redução apenas da carga de parasitas. A atividade de arginase não sofreu diminuição. Na verdade a inibição de IL-10R provocou um aumento ainda maior na atividade de arginase no local da infecção. É possível que este aumento na atividade de arginase seja um reflexo da presença de uma maior infiltração inflamatória no local da infecção, visto que camundongos depletados de neutrófilos tratados com anti-IL-10R apresentaram lesões ainda maiores que camundongos apenas depletados de neutrófilos. Assim, nossos resultados *in vivo* não apontam para um papel da enzima arginase na proliferação do parasita induzida por IL-10. É possível que a IL-10 esteja atuando no sentido de comprometer as propriedades microbicidas dos macrófagos. A citocina IL-10, quando administrada antes da estimulação com IFN- γ , é capaz de prevenir a fosforilação de STAT1 e de induzir a expressão de SOCS3, inibindo, portanto, a expressão de uma série de genes induzidos por IFN- γ . Na infecção por *L. major*, o tratamento com IL-10 três horas antes da estimulação com IFN- γ tornou os macrófagos incapazes de responder aos efeitos ativadores do IFN- γ , prevenindo, assim, a morte do parasita (Kane & Mosser, 2001). Na infecção por *M. bovis*, a adição de IL-10 exógena antes da estimulação com IFN- γ inibiu a produção de TNF- α e NO, bem como a inibição do crescimento bacteriano (Flesch *et al.*, 1994). Portanto, é possível que a IL-10 esteja favorecendo a proliferação do parasita por meio da desativação dos macrófagos através da inibição da produção de IL-12, TNF- α e NO. Nós testamos estas hipóteses *in vitro*, e as discutiremos posteriormente.

A produção de anticorpos tem um papel importante nas respostas imunes a *Leishmania*. Camundongos deficientes para o receptor Fc γ são mais resistentes a infecções por *L. major* e *L. mexicana* (Buxbaum & Scott, 2005; Miles *et al.*, 2005a). Além disso, células B e anticorpos foram implicados na patogênese das infecções por *L. amazonensis* (Miles *et al.*, 2005a; Wanasen *et al.*, 2008). Em nosso trabalho mostramos que na ausência de neutrófilos houve susceptibilidade aumentada à infecção, associada a uma produção de maiores níveis de IgG1 e IgG2a anti-*L. amazonensis*. É importante destacar que, em

diferentes modelos de infecção por *Leishmania*, a ligação do receptor de Fc γ na superfície de macrófagos por um complexo formado por *Leishmania* ligada a IgG promove a produção de IL-10 (Buxbaum & Scott, 2005; Lucas *et al.*, 2005; Miles *et al.*, 2005a; Yang *et al.*, 2007). Além disso, já foi claramente demonstrado que imunocomplexos contribuem para a progressão da doença por induzirem macrófagos ativados a produzir IL-10 (Miles *et al.*, 2005a). Ademais, a densidade de IgG nos imunocomplexos regula a produção de citocinas por macrófagos, de modo que baixas densidades de IgG levam apenas à fagocitose do parasita, enquanto altas densidades de IgG levam também à indução da expressão de IL-10 (Gallo *et al.*, 2010). Nós também encontramos uma correlação entre maiores níveis de anticorpos, secreção aumentada de IL-10 e maior susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis*. Por essa razão, resolvemos testar a hipótese de que a ligação dos imunocomplexos de *L. amazonensis* e IgG a receptores de Fc γ estaria promovendo o aumento de IL-10 observado nos camundongos depletados de neutrófilos. Nossos dados *in vitro* confirmaram os dados da literatura mostrando que a estimulação com imunocomplexos favorece a produção de altos níveis de IL-10. Mas é importante destacarmos que o próprio parasita na forma promastigota foi capaz de induzir a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS, de modo que a IL-10 induzida pelo próprio parasita pode representar uma importante estratégia de evasão da resposta imune. Quando tratamos camundongos depletados de neutrófilos com anticorpo anti-Fc γ houve uma redução nos níveis de IL-10 produzidos, indicando que o aumento na produção de IL-10 em camundongos depletados de neutrófilos parece ser, pelo menos parcialmente, dependente do aumento nos níveis de IgG. Mas como a presença dos neutrófilos nos primeiros dias de infecção poderia alterar os níveis de anticorpos específicos anti-*L. amazonensis*? Neutrófilos são capazes de influenciar a disponibilidade de antígenos durante respostas imunes a antígenos proteicos por competição por antígenos (Yang *et al.*, 2010). De fato, nós encontramos promastigotas extracelulares viáveis nas orelhas de camundongos depletados de neutrófilos, mas não naqueles dotados de neutrófilos (dado não mostrado). Dessa forma, nós acreditamos que na ausência de neutrófilos há mais parasitas disponíveis para a indução da produção de IgG anti-*L. amazonensis*.

Nossos resultados indicam que na ausência de neutrófilos há uma redução nos níveis de células T regulatórias nas orelhas infectadas uma semana após a infecção. Já foi demonstrado que porcentagens relativamente altas de células T regulatórias são encontradas em orelhas infectadas por *L. amazonensis* durante as primeiras três semanas de infecção (Ji *et al.*, 2005). Células T regulatórias naturais se desenvolvem no timo e são reguladas por células T auto-reativas na periferia. Assim, tais células estão presentes no hospedeiro antes mesmo da

exposição a patógenos e podem ser recrutadas rapidamente para o sítio de infecção em resposta a antígenos próprios que podem se tornar expostos durante a infecção (Belkaid & Rouse, 2005). Células T regulatórias medeiam a supressão imune por vários mecanismos, incluindo produção de IL-10 e TGF- β , indução de apoptose devido à remoção de fator de crescimento, expressão de moléculas inibitórias como CTLA4 e TIGIT (Littman & Rudensky, 2010). É interessante destacarmos que a presença de células T regulatórias na lesão durante os estágios iniciais de infecção por *L. amazonensis* restringe o desenvolvimento de lesões (Ji *et al.*, 2005). Estes dados estão em conformidade com nossos resultados, visto que encontramos desenvolvimento acelerado de lesões associado a menores percentagens de células T regulatórias em camundongos deficientes de neutrófilos. Portanto, nossos dados sugerem que a presença de neutrófilo no momento da infecção contribui para manutenção dos níveis de células T regulatórias no local da infecção e tais células podem contribuir para o controle do desenvolvimento inicial de lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.

Assim, na primeira parte de nosso trabalho, nós demonstramos que neutrófilos controlam a carga de parasitas e o desenvolvimento de lesões durante infecções por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c. Na ausência de neutrófilos, encontramos altos níveis de IgG anti-*L. amazonensis* e elevada produção de IL-10. Nós demonstramos que o aumento da produção de IL-10 observado na ausência dos neutrófilos promoveu a proliferação dos parasitas e que a indução de IL-10 foi pelo menos parcialmente dependente do aumento nos níveis de IgG. Além disso, vimos que o próprio parasita foi capaz de induzir a produção de IL-10 por macrófagos. Apesar de termos encontrado um aumento da atividade de arginase associado com maior carga de parasitas, não encontramos indícios de que a multiplicação do parasita seja modificada pelo aumento da atividade de arginase. Além disso, o aumento nos níveis de IL-10 não explica o desenvolvimento acelerado de lesões, uma vez que o tratamento com anti-IL-10R não reverteu esta situação. Na verdade, o bloqueio do receptor da IL-10 resultou em aumento ainda maior no tamanho das lesões durante a primeira semana de infecção. Estes resultados sugerem que IL-10 apresenta uma papel dual durante os estágios iniciais de infecção por *L. amazonensis*: por um lado, IL-10 favorece a sobrevivência ou proliferação do parasita; por outro lado, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, IL-10 protege os camundongos do desenvolvimento exacerbado de lesões. Finalmente, nós mostramos que neutrófilos controlam não apenas o parasitismo, mas também o desenvolvimento de lesões, que pode ser, pelo menos em parte, atribuído à manutenção de maiores percentagens de células T regulatórias observadas em camundongos suficientes de

neutrófilos, que exercem efeitos anti-inflamatórios no local da infecção. Assim, a presença dos neutrófilos no momento da infecção garante a eliminação do parasita, o controle da produção de anticorpos e de citocinas e a manutenção de células T regulatórias no local da infecção, favorecendo o controle dos níveis de parasitas e o desenvolvimento de lesões.

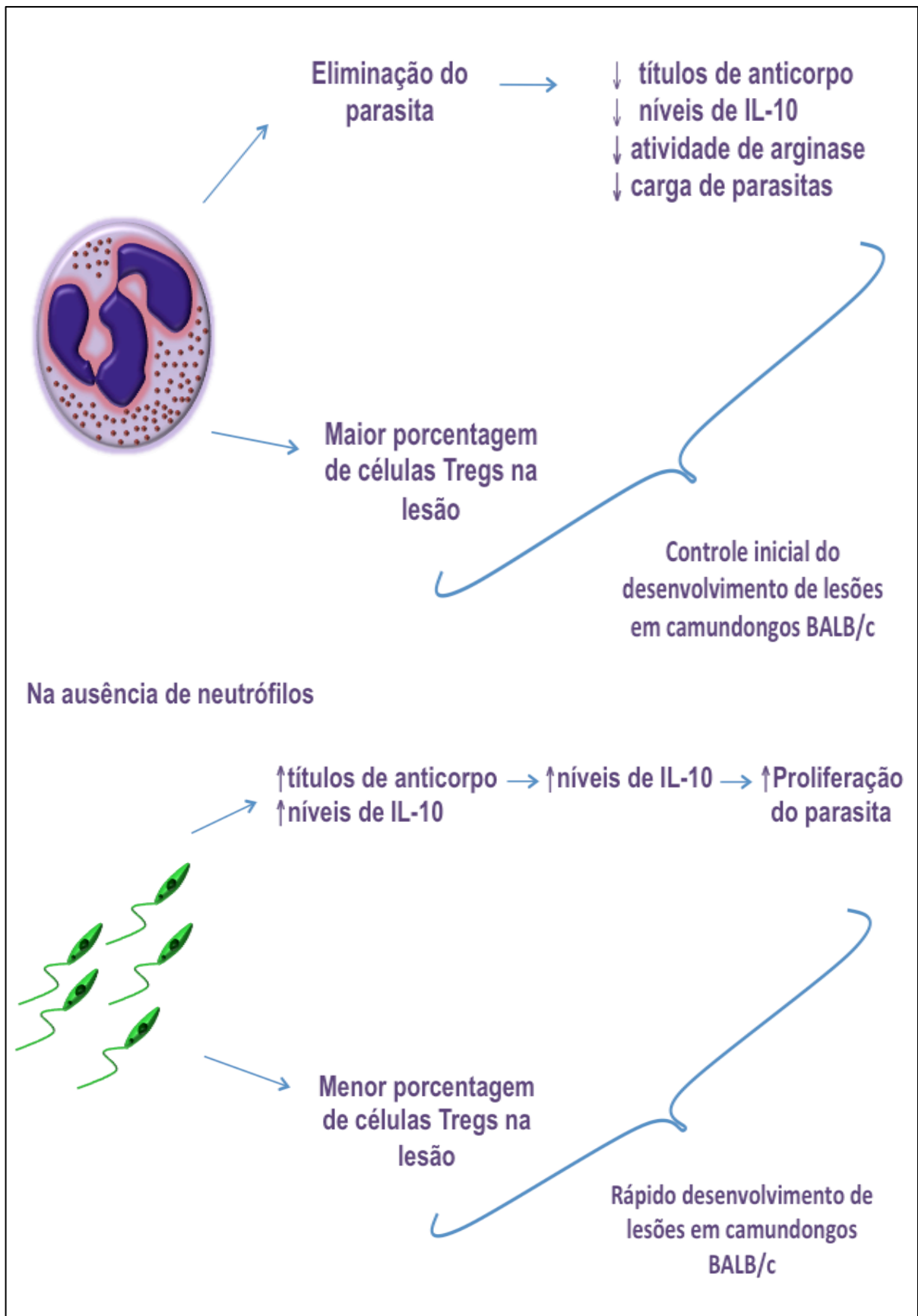


Figura 1: Resumo esquemático do papel dos neutrófilo na infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c.

Na segunda parte de nosso trabalho resolvemos investigar como a citocina IL-10 poderia favorecer a sobrevivência do parasita utilizando um modelo de infecção *in vitro*. Para isso, resolvemos trabalhar com macrófagos, visto que estes representam as células hospedeiras de parasitas do gênero *Leishmania*. Peters e colaboradores (2008) demonstraram que logo após a infecção há uma migração massiva de neutrófilos que são extremamente eficientes na fagocitose de promastigotas de *L. major*. Com o tempo, tais neutrófilos entram em apoptose e liberam parasitas viáveis e altamente móveis (vídeo S12), que infectam os macrófagos recém-chegados ao sítio de infecção (Peters *et al.*, 2008). Apesar de no nosso trabalho termos observado um importante papel dos neutrófilos na proteção contra *L. amazonensis*, é provável que alguns parasitas sobrevivam no interior dos neutrófilos e possam infectar em seguida macrófagos. Assim, em nossos experimentos *in vitro*, nós infectamos macrófagos derivados de medula óssea com formas promastigotas de *L. amazonensis*, uma vez que estudos anteriores mostraram que os parasitas liberados pelos neutrófilos apresentavam alta motilidade. Em nossos experimentos *in vitro* nos deparamos com um dado muito interessante: infecção com formas promastigotas de *L. amazonensis* resultou na indução da produção de altos níveis de IL-10 e na supressão de IL-12 em macrófagos estimulados com LPS. Por outro lado, a infecção de macrófagos não estimulados não induziu produção de IL-10 ou IL-12, indicando que o parasita sozinho não é capaz de induzir produção de citocinas, mas é capaz de alterar a produção de citocinas induzida por um estímulo inflamatório como LPS. A supressão produção de IL-12 induzida por LPS por parasitas do gênero *Leishmania* é muito bem descrita na literatura. Promastigotas de *L. major* e de *L. donovani* e amastigotas de *L. major* e *L. mexicana* suprimem a produção de IL-12 induzida por LPS (Cameron *et al.*, 2004; Carrera *et al.*, 1996; Chandra & Naik, 2008; Weinheber *et al.*, 1998). A indução da produção IL-10 por promastigotas de *L. major* opsonizadas em macrófagos estimulados com LPS também já havia sido reportada (Carrera *et al.*, 1996). Além disso, a infecção de macrófagos estimulados com LPS com formas amastigotas derivadas de lesão de *L. major* e *L. amazonensis* também induziu a produção de IL-10 (Kane & Mosser, 2001). Porém, neste trabalho ficou demonstrado que as amastigotas derivadas da lesão apresentam imunoglobulinas em sua superfície e era a ligação deste imunocomplexos de *Leishmania* + IgG a receptores Fc γ que induzia a produção de IL-10 em tais macrófagos. Assim, ficou claro que não era o parasita em si que estava induzindo a produção de IL-10 e sim a ligação de imunocomplexos. Dessa forma, podemos inferir que no trabalho em que foi demonstrada a indução de IL-10 por promastigotas opsonizadas de *L. major*, o efeito observado se deve à ligação do imunocomplexo formado promastigotas e IgG a receptores de Fc γ . No entanto,

outros dois relatos apontam para um papel direto de parasitas do gênero *Leishmania* na indução da produção de IL-10 por macrófagos. No primeiro deles, foi demonstrado que promastigotas de *L. donovani* estimulam a produção de IL-10 por macrófagos tratados com LPS (ligante de TLR4) ou Pam3cys (ligante de TLR2) (Chandra & Naik, 2008). No segundo, promastigotas de *L. major* foram capazes de induzir a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com anti-CD40 (Mathur *et al.*, 2004). Ainda assim, nosso trabalho representa o primeiro relato de que promastigotas não opsonizadas de *L. amazonensis* são capazes de induzir a produção de altos níveis de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS. Formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* não foram capazes de induzir a produção de IL-10, como demonstrado anteriormente por Kane e Mosser (2001). Por outro lado, as amastigotas axênicas foram capazes de inibir a secreção de IL-12. Deste modo, a indução de IL-10 parece ser uma característica estágio-específica, enquanto a supressão de IL-12 pode ser induzida por parasitas tanto na forma amastigota quanto na forma promastigota.

É interessante destacarmos que em nossas mãos apenas formas promastigotas de *L. amazonensis* forma capazes de induzir a produção de altos níveis de IL-10. A infecção de macrófagos estimulados com LPS com promastigotas de *L. major* produziu apenas um pequeno aumento nos níveis de IL-10, enquanto a infecção com promastigotas de *L. braziliensis* não induziu aumento na secreção de IL-10. Mais uma vez, a capacidade de suprimir a produção de IL-12 foi detectada nas três espécies de *Leishmania* por nós investigadas. Assim, nossos dados sugerem que diferentes estágios evolutivos e distintas espécies de *Leishmania* são capazes de induzir a produção de IL-12, porém apenas formas promastigotas de *L. amazonensis* são capazes de induzir a produção de altos níveis de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS.

Uma vez que é provável que altos níveis de LPS só estejam presentes nas lesões cutâneas por *Leishmania* durante superinfecções bacterianas, em estágios mais tardios da infecção (el-On *et al.*, 1992), procuramos verificar se a infecção com promastigotas de *L. amazonensis* afetaria a produção de citocinas por macrófagos tratados com outro estímulo inflamatório. O estímulo utilizado em nossos experimentos foi fragmentos de baixo peso molecular de ácido hialurônico (HA). O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano não sulfatado e é o principal componente da matriz extracelular. Durante um evento de dano tecidual ou inflamatório, o ácido hialurônico é progressivamente clivado resultando em fragmentos de ácido hialurônico de menor tamanho. Tais fragmentos de ácido hialurônico são capazes de se ligar e sinalizar via TLR4 (Jiang *et al.*, 2007). Inclusive, já foi demonstrado que fragmentos de ácido hialurônico isolados de indivíduos com dano pulmonar agudo podem

ativar macrófagos a produzir quimiocinas de maneira dependente de TLR2 e TLR4 (Jiang *et al.*, 2005). Em nosso trabalho, nós demonstramos que a infecção com promastigotas de *L. amazonensis* também induz a produção de IL-10 e suprime a produção de IL-12 por macrófagos estimulados com fragmentos de ácido hialurônico. Este resultado reforça a importância dos nossos achados e dá maior significado biológico à indução de IL-10 pelo parasita, visto que ela pode ocorrer na presença de um estímulo encontrado em abundância nos tecidos inflamados.

Promastigotas de *L. amazonensis* parecem ter desenvolvido um mecanismo de evasão da resposta imune, caracterizado pela supressão da secreção de IL-12 e indução da produção de altos níveis de IL-10. Nossos resultados *in vivo* revelam que um aumento na produção de IL-10 em camundongos deficientes de neutrófilos resulta em carga de parasitas aumentada. Mas como relacionar a indução de IL-10 a um aumento na carga de parasitas? Nossa hipótese inicial era que a IL-10 induzida pelo parasita estaria atuando de maneira autócrina ou parácrina, desativando o macrófago e tornando-o incapaz de responder ao estímulo ativador da citocina IFN- γ . A adição de IL-10 exógena antes da estimulação com IFN- γ inibe a indução de TNF- α e de óxido nítrico, favorecendo a sobrevivência e proliferação da bactéria *Mycobacterium bovis* (Flesch *et al.*, 1994). Macrófagos que expressam IL-10 constitutivamente também apresentam menor resistência à infecção por *M. bovis* (Lang *et al.*, 2002). Em outro trabalho, o tratamento com IL-10 duas horas antes da adição de IFN- γ induziu a expressão de SOCS3 e preveniu a fosforilação de STAT1, inibindo, assim, a expressão de uma série de genes induzidos por IFN- γ (Ito *et al.*, 1999). O tratamento com IL-10 três horas antes da estimulação com IFN- γ em macrófagos infectados com *L. major* resultou em um aumento significativo da carga de parasitas no interior dos macrófagos (Kane & Mosser, 2001). Em nosso trabalho, o tratamento com IFN- γ três horas após a estimulação com LPS ainda foi capaz de inibir o crescimento do parasita. Podemos explicar este resultado de duas formas: existe a possibilidade de que três horas não seja tempo bastante para que haja expressão suficiente de IL-10 e para que esta citocina possa exercer seus efeitos; a outra possibilidade é que a nossa hipótese inicial não se aplica ao nosso modelo de infecção. Assim, nas condições que testamos, a IL-10 endógena não foi capaz de desativar a resposta microbiana induzida por IFN- γ , porém, para nossa surpresa, ela foi capaz de favorecer a replicação do parasita. Dessa forma, a IL-10 induzida pelo parasita parece ter um efeito direto sobre o macrófago, favorecendo a multiplicação do parasita no interior do macrófago.

A nossa próxima pergunta foi como a IL-10 poderia estar favorecendo a replicação do parasita? Já foi demonstrado que a adição de IL-10 exógena inibe a morte intracelular de

L. infantum e *L. major* por macrófagos humanos por diminuir a geração de óxido nítrico (Vouldoukis *et al.*, 1997). Na infecção por *M. bovis*, a IL-10 também atua no bloqueio da inibição do crescimento bacteriano, provavelmente devido à inibição da indução da produção de TNF- α e de NO (Flesch *et al.*, 1994). A IL-10 exógena também inibe a produção de NO em macrófagos infectados com *Schistosoma mansoni*, o que previne a eliminação das larvas de *Schistosoma* (Oswald *et al.*, 1992). Em nosso trabalho, o bloqueio da IL-10 endógena em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e estimulados com LPS não alterou a expressão da enzima iNOS nem afetou significativamente a secreção de IL-12 e TNF- α , o que indica que a IL-10 não está exercendo seus efeitos através da inibição da expressão de iNOS e da síntese de IL-12 e TNF- α . É interessante destacarmos que nos macrófagos não infectados e estimulados com LPS, o bloqueio da IL-10 aumenta os níveis tanto de TNF- α quanto de IL-12, indicando que em macrófagos estimulados com LPS a IL-10 controla os níveis de TNF- α e IL-12. De fato já foi demonstrado que tanto a adição de IL-10 exógena quanto a expressão constitutiva de IL-10 em macrófagos suprime a produção de uma série de moléculas induzidas por LPS, inclusive as citocinas TNF- α e IL-12 (Berlato *et al.*, 2002; Fiorentino *et al.*, 1991; Lang *et al.*, 2002). Portanto, em nosso trabalho, a IL-10 endógena teve papéis diferentes na ausência e na presença do parasita. Na ausência do parasita, a IL-10 endógena parece controlar tanto os níveis de TNF- α quanto os de IL-12 induzidos por LPS. No entanto, a IL-10 endógena produzida em resposta à infecção não controla os níveis de TNF- α e IL-12 nem a expressão de iNOS. Dessa forma, a supressão da secreção de IL-12 é independente do aumento da produção de IL-10. Com relação à produção de óxido nítrico, a estimulação com LPS induziu a produção de NO tanto nos macrófagos não infectados quanto nos infectados e a infecção não alterou os níveis de NO produzidos. No entanto, foram produzidos níveis muito baixos de NO em todas as condições avaliadas. Quando relacionamos o dado da produção de NO com os dados do parasitismo, observamos que os macrófagos infectados estimulados com LPS apresentaram maior carga de parasitas, apesar dos maiores níveis de NO observados em relação aos macrófagos não estimulados. Dessa forma, nossos dados indicam o aumento na proliferação dos parasitas associado à produção aumentada de IL-10 não se deve a uma redução na produção de óxido nítrico.

Aparentemente o efeito da IL-10 sobre a proliferação de *L. amazonensis* não está relacionado com a inativação dos macrófagos. Outra possibilidade é que IL-10 esteja favorecendo a proliferação dos parasitas pela indução da enzima arginase, que regula diretamente a proliferação do parasita por afetar a síntese de poliaminas (Corraliza *et al.*, 1995; Iniesta *et al.*, 2002). Como discutimos anteriormente, nossos dados *in vivo* não

apontaram para um papel da arginase na proliferação do parasita induzida por IL-10, uma vez que o bloqueio da IL-10 inibiu o crescimento do parasita, porém resultou em aumento na atividade de arginase. Não obstante, tais resultados não negam a possibilidade de que a IL-10 esteja favorecendo a replicação do parasita pela indução da enzima arginase. O aumento da atividade de arginase observado nos animais que foram tratados com anti-IL-10R pode estar relacionado com o fato de que nestes animais as lesões foram muito maiores, de modo que o aumento na atividade de arginase pode estar relacionado simplesmente com um aumento do infiltrado inflamatório, ou seja, um aumento no número de células no local da infecção. Nossos experimentos *in vitro* revelam que a estimulação com LPS resulta em aumento na atividade de arginase, tanto nos macrófagos infectados quanto nos não infectados, porém a infecção não altera a atividade de arginase. Assim, o aumento da secreção de IL-10 induzido pela infecção por *L. amazonensis* não foi associado à modulação da atividade da enzima arginase. Dessa forma, a proliferação do parasita induzida por IL-10 não parece estar relacionada com indução da atividade de arginase.

Vários fatores de transcrição foram implicados na transcrição da citocina IL-10. Sp1 parece ser um mediador central da indução de IL-10 e um elemento responsivo a Sp1 foi localizado no promotor da IL-10 (Brightbill *et al.*, 2000; Tone *et al.*, 2000). STAT3 também se liga a um elemento no promotor da IL-10 em humanos (Benkhart *et al.*, 2000). Além disso, já foi demonstrado que c-Maf é um fator de transcrição essencial para a expressão de IL-10 em macrófagos (Cao *et al.*, 2005). A indução da produção de IL-10 por meio da estimulação com LPS e imunocomplexos requer a ativação das MAP quinases ERK e p38 (Lucas *et al.*, 2005). A ativação de ERK promove uma fosforilação rápida e transiente da histona H3 em regiões específicas do promotor da IL-10 resultando na exposição transiente do promotor da IL-10 para ligação dos fatores de transcrição Sp1 e STAT3 (Zhang *et al.*, 2006). Mathur e colaboradores (2004) demonstraram que promastigotas de *L. major* são capazes de alterar a sinalização via CD40 em macrófagos no sentido de ativação de ERK e indução da produção de IL-10. Promastigotas de *L. donovani* também aumentam a produção de IL-10 pela ativação da fosforilação de ERK1/2 (Chandra & Naik, 2008). Em nosso trabalho, nós também observamos que a sinalização via ERK parece ser importante para a produção de IL-10 induzida por promastigotas de *L. amazonensis*. É interessante destacarmos que o bloqueio da via da ERK1/2 utilizando U0126 reverteu o aumento da proliferação do parasita no interior dos macrófagos em resposta a produção de IL-10 induzida pelo próprio parasita. Nossos dados indicam, portanto, que o parasita parece ter evoluído um mecanismo capaz de subverter a atividade microbicida de macrófagos, no qual o próprio parasita parece induzir a produção

de IL-10, por uma via dependente de ERK, e esta IL-10 atua de maneira endócrina ou parácrina favorecendo a replicação do parasita nos macrófagos, por um mecanismo independente de inibição da síntese de IL-12, TNF- α e NO e da indução atividade da enzima arginase.

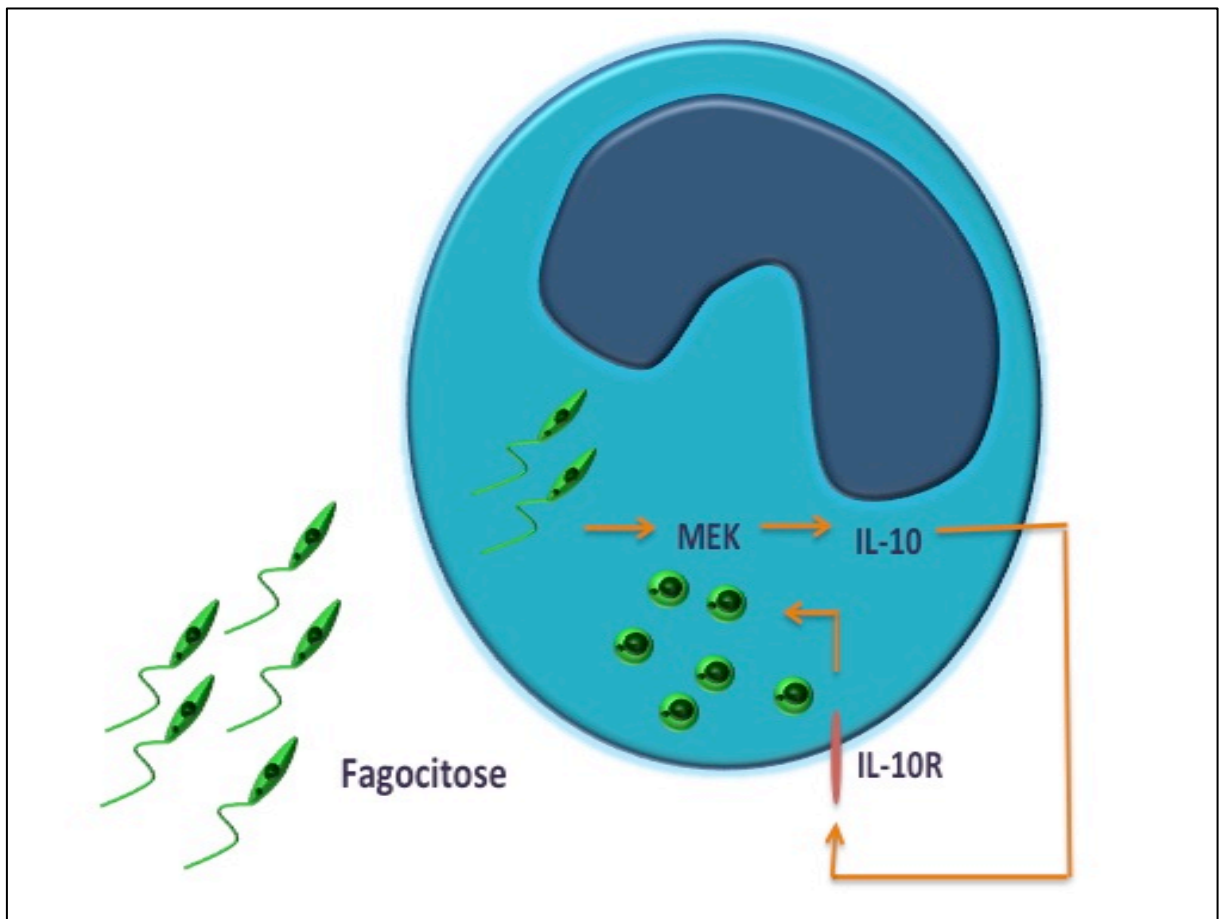


Figura 2: Promastigotas de *L. amazonensis* evoluíram um mecanismo de evasão da atividade microbicida de macrófagos, no qual os parasitas induzem a produção de IL-10, que atua de maneira autócrina favorecendo a replicação do parasita.

6 – CONCLUSÃO

Em conclusão, neste trabalho nós demonstramos que os neutrófilos apresentam um papel protetor nos estágios iniciais da infecção por *L. amazonensis* no camundongo BALB/c, controlando a carga de parasitas e o desenvolvimento de lesões. Na ausência de neutrófilos, encontramos altos níveis de IgG anti-*L. amazonensis* e elevada produção de IL-10. Este aumento nos níveis de IgG provocou um aumento nos níveis de IL-10, que por sua vez promoveu a proliferação dos parasitas. Em nosso modelo nós observamos que não só os imunocomplexos são importantes na indução da produção de IL-10 por macrófagos, o parasita parece ter evoluído um mecanismo capaz de subverter a atividade microbicida de macrófagos, no qual ele próprio induzir a produção de IL-10, por uma via dependente de ERK, e esta IL-10 atua de maneira endócrina ou parácrina favorecendo a replicação do parasita nos macrófagos, por um mecanismo independente de inibição da síntese de IL-12, TNF- α e NO e da indução atividade da enzima arginase. Assim, em resumo, a presença dos neutrófilos no momento da infecção garante a eliminação do parasita, o controle da produção de anticorpos e de citocinas, principalmente IL-10 que atua diretamente sobre os macrófagos favorecendo a replicação do parasita, e a manutenção de células T regulatórias no local da infecção, favorecendo o controle dos níveis de parasitas e do desenvolvimento de lesões.

7 – REFERÊNCIAS

- Abadie, V., Badell, E., Douillard, P., Ensergueix, D., Leenen, P. J., Tanguy, M., Fiette, L., Saeland, S., Gicquel, B. & Winter, N. (2005). Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*, 106(5), 1843-1850.
- Afonso, L., Borges, V. M., Cruz, H., Ribeiro-Gomes, F. L., DosReis, G. A., Dutra, A. N., Clarencio, J., de Oliveira, C. I., Barral, A., Barral-Netto, M. & Brodskyn, C. I. (2008). Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol*, 84(2), 389-396.
- Afonso, L. C. & Scott, P. (1993). Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun*, 61(7), 2952-2959.
- Aga, E., Katschinski, D. M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., Solbach, W. & Laskay, T. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*, 169(2), 898-905.
- Ahluwalia, S., Lawn, S. D., Kanagalingam, J., Grant, H. & Lockwood, D. N. (2004). Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America. *BMJ*, 329(7470), 842-844.
- Allenbach, C., Zufferey, C., Perez, C., Launois, P., Mueller, C. & Tacchini-Cottier, F. (2006). Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by *Leishmania major*. *J Immunol*, 176(11), 6656-6664.
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. & W. H. O. Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5), e35671.
- Appelberg, R. (2007). Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol*, 15(2), 87-92.

- Appelberg, R., Castro, A. G. & Silva, M. T. (1994). Neutrophils as effector cells of T-cell-mediated, acquired immunity in murine listeriosis. *Immunology*, 83(2), 302-307.
- Araujo-Jorge, T., Rivera, M. T., el Bouhdidi, A., Daeron, M. & Carlier, Y. (1993). An Fc gamma RII-, Fc gamma RIII-specific monoclonal antibody (2.4G2) decreases acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun*, 61(11), 4925-4928.
- Balestieri, F. M., Queiroz, A. R., Scavone, C., Costa, V. M., Barral-Netto, M. & Abrahamsohn Ide, A. (2002). *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect*, 4(1), 23-29.
- Barcelos, L. S., Talvani, A., Teixeira, A. S., Vieira, L. Q., Cassali, G. D., Andrade, S. P. & Teixeira, M. M. (2005). Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol*, 78(2), 352-358.
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi Junior, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro de Jesus, A., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M. & Carvalho, E. M. (1991). Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*, 44(5), 536-546.
- Bates, P. A. (1994). The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol*, 79(2), 215-218.
- Beil, W. J., Meinardus-Hager, G., Neugebauer, D. C. & Sorg, C. (1992). Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol*, 52(2), 135-142.
- Belkaid, Y., Hoffmann, K. F., Mendez, S., Kamhawi, S., Udey, M. C., Wynn, T. A. & Sacks, D. L. (2001). The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*, 194(10), 1497-1506.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M. & Sacks, D. L. (2002). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, 420(6915), 502-507.

- Belkaid, Y. & Rouse, B. T. (2005). Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*, 6(4), 353-360.
- Belosevic, M., Finbloom, D. S., Van Der Meide, P. H., Slayter, M. V. & Nacy, C. A. (1989). Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol*, 143(1), 266-274.
- Benkhart, E. M., Siedlar, M., Wedel, A., Werner, T. & Ziegler-Heitbrock, H. W. (2000). Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol*, 165(3), 1612-1617.
- Bennouna, S., Bliss, S. K., Curiel, T. J. & Denkers, E. Y. (2003). Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol*, 171(11), 6052-6058.
- Berlato, C., Cassatella, M. A., Kinjyo, I., Gatto, L., Yoshimura, A. & Bazzoni, F. (2002). Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol*, 168(12), 6404-6411.
- Bliss, S. K., Butcher, B. A. & Denkers, E. Y. (2000). Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol*, 165(8), 4515-4521.
- Bliss, S. K., Marshall, A. J., Zhang, Y. & Denkers, E. Y. (1999). Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J Immunol*, 162(12), 7369-7375.
- Bogdan, C., Vodovotz, Y. & Nathan, C. (1991). Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med*, 174(6), 1549-1555.
- Bonneau, M., Epardaud, M., Payot, F., Niborski, V., Thoulouze, M. I., Bernex, F., Charley, B., Riffault, S., Guilloteau, L. A. & Schwartz-Cornil, I. (2006). Migratory monocytes and granulocytes are major lymphatic carriers of *Salmonella* from tissue to draining lymph node. *J Leukoc Biol*, 79(2), 268-276.

- Borregaard, N., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Diamond, M. S., Springer, T. A., Anderson, H. C., Kishimoto, T. K. & Bainton, D. F. (1994). Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*, 56(1), 80-87.
- Borregaard, N., Sorensen, O. E. & Theilgaard-Monch, K. (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*, 28(8), 340-345.
- Bradley, P. P., Priebe, D. A., Christensen, R. D. & Rothstein, G. (1982). Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78(3), 206-209.
- Brightbill, H. D., Plevy, S. E., Modlin, R. L. & Smale, S. T. (2000). A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J Immunol*, 164(4), 1940-1951.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y. & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535.
- Buxbaum, L. U. & Scott, P. (2005). Interleukin 10- and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infect Immun*, 73(4), 2101-2108.
- Calegari-Silva, T. C., Pereira, R. M., De-Melo, L. D., Saraiva, E. M., Soares, D. C., Bellio, M. & Lopes, U. G. (2009). NF-κB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol Lett*, 127(1), 19-26.
- Cameron, P., McGachy, A., Anderson, M., Paul, A., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Alexander, J. & Plevin, R. (2004). Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-κB signaling pathway. *J Immunol*, 173(5), 3297-3304.
- Cao, S., Liu, J., Song, L. & Ma, X. (2005). The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J Immunol*, 174(6), 3484-3492.

- Carlsen, E. D., Hay, C., Henard, C. A., Popov, V., Garg, N. J. & Soong, L. (2013). *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infect Immun*, 81(11), 3966-3974.
- Carrera, L., Gazzinelli, R. T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R. & Sacks, D. L. (1996). *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med*, 183(2), 515-526.
- Chandra, D. & Naik, S. (2008). *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol*, 154(2), 224-234.
- Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A. E. & 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(2), e1000755.
- 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(2), 288-299.
- Chatelain, R., Varkila, K. & Coffman, R. L. (1992). IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J Immunol*, 148(4), 1182-1187.
- Chen, L., Zhang, Z. H., Watanabe, T., Yamashita, T., Kobayakawa, T., Kaneko, A., Fujiwara, H. & Sendo, F. (2005). The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int*, 54(2), 109-118.
- Conlan, J. W. & North, R. J. (1994). Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med*, 179(1), 259-268.
- Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G. & Modolell, M. (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*, 174(1-2), 231-235.

- Corraliza, I. M., Soler, G., Eichmann, K. & Modolell, M. (1995). Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 206(2), 667-673.
- Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*, 180(9), 5771-5777.
- Daley, J. M., Thomay, A. A., Connolly, M. D., Reichner, J. S. & Albina, J. E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*, 83(1), 64-70.
- Davies, C. R., Kaye, P., Croft, S. L. & Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ*, 326(7385), 377-382.
- de Bruijn, M. F., Slieker, W. A., van der Loo, J. C., Voerman, J. S., van Ewijk, W. & Leenen, P. J. (1994). Distinct mouse bone marrow macrophage precursors identified by differential expression of ER-MP12 and ER-MP20 antigens. *Eur J Immunol*, 24(10), 2279-2284.
- de Oca, R. M., Buendia, A. J., Del Rio, L., Sanchez, J., Salinas, J. & Navarro, J. A. (2000). Polymorphonuclear neutrophils are necessary for the recruitment of CD8(+) T cells in the liver in a pregnant mouse model of *Chlamydomydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Infect Immun*, 68(3), 1746-1751.
- de Souza Carmo, E. V., Katz, S. & Barbieri, C. L. (2010). Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PLoS One*, 5(11), e13815.
- Deng, W., Thiel, B., Tannenbaum, C. S., Hamilton, T. A. & Stuehr, D. J. (1993). Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*, 151(1), 322-329.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27(5), 305-318.
- Dowlati, Y. (1996). Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin Dermatol*, 14(5), 425-431.

- el-On, J., Sneier, R. & Elias, E. (1992). *Leishmania major*: bacterial contamination of cutaneous lesions in experimental animals. *Isr J Med Sci*, 28(12), 847-851.
- Favali, C., Tavares, N., Clarencio, J., Barral, A., Barral-Netto, M. & Brodskyn, C. (2007). *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 82(6), 1401-1406.
- Filardy, A. A., Pires, D. R., Nunes, M. P., Takiya, C. M., Freire-de-Lima, C. G., Ribeiro-Gomes, F. L. & DosReis, G. A. (2010). Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J Immunol*, 185(4), 2044-2050.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. & O'Garra, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 147(11), 3815-3822.
- Fleming, T. J., Fleming, M. L. & Malek, T. R. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol*, 151(5), 2399-2408.
- Flesch, I. E., Hess, J. H., Oswald, I. P. & Kaufmann, S. H. (1994). Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN-gamma stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor-alpha and by IL-10. *Int Immunol*, 6(5), 693-700.
- Gabriel, C., McMaster, W. R., Girard, D. & Descoteaux, A. (2010). *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. *J Immunol*, 185(7), 4319-4327.
- Gallo, P., Goncalves, R. & Mosser, D. M. (2010). The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunol Lett*, 133(2), 70-77.
- Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L. & Sher, A. (1992). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol*, 148(6), 1792-1796.

- Ghalib, H. W., Piuevezam, M. R., Skeiky, Y. A., Siddig, M., Hashim, F. A., el-Hassan, A. M., Russo, D. M. & Reed, S. G. (1993). Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest*, 92(1), 324-329.
- Gomes, I. N., Calabrich, A. F., Tavares Rda, S., Wietzerbin, J., de Freitas, L. A. & Veras, P. S. (2003). Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect*, 5(4), 251-260.
- Green, S. J., Crawford, R. M., Hockmeyer, J. T., Meltzer, M. S. & Nacy, C. A. (1990a). *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 145(12), 4290-4297.
- Green, S. J., Meltzer, M. S., Hibbs, J. B., Jr. & Nacy, C. A. (1990b). Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol*, 144(1), 278-283.
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G. & Desjardins, M. (2008). Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol*, 10(1), 100-111.
- Guimaraes, E. T., Santos, L. A., Ribeiro dos Santos, R., Teixeira, M. M., dos Santos, W. L. & Soares, M. B. (2006). Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect*, 8(5), 1219-1226.
- Guimaraes-Costa, A. B., Nascimento, M. T., Froment, G. S., Soares, R. P., Morgado, F. N., Conceicao-Silva, F. & Saraiva, E. M. (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(16), 6748-6753.
- Guler, M. L., Gorham, J. D., Hsieh, C. S., Mackey, A. J., Steen, R. G., Dietrich, W. F. & Murphy, K. M. (1996). Genetic susceptibility to *Leishmania*: IL-12 responsiveness in TH1 cell development. *Science*, 271(5251), 984-987.
- Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L. & Locksley, R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or

- progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med*, 169(1), 59-72.
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, 354(9185), 1191-1199.
- Hodge-Dufour, J., Noble, P. W., Horton, M. R., Bao, C., Wysoka, M., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Trinchieri, G. & Pure, E. (1997). Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J Immunol*, 159(5), 2492-2500.
- Iniesta, V., Carcelen, J., Molano, I., Peixoto, P. M., Redondo, E., Parra, P., Mangas, M., Monroy, I., Campo, M. L., Nieto, C. G. & Corraliza, I. (2005). Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun*, 73(9), 6085-6090.
- Iniesta, V., Gomez-Nieto, L. C., Molano, I., Mohedano, A., Carcelen, J., Miron, C., Alonso, C. & Corraliza, I. (2002). Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol*, 24(3), 113-118.
- Ito, S., Ansari, P., Sakatsume, M., Dickensheets, H., Vazquez, N., Donnelly, R. P., Larner, A. C. & Finbloom, D. S. (1999). Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*, 93(5), 1456-1463.
- Ji, J., Masterson, J., Sun, J. & Soong, L. (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol*, 174(11), 7147-7153.
- Ji, J., Sun, J., Qi, H. & Soong, L. (2002). Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg*, 66(4), 338-345.
- Ji, J., Sun, J. & Soong, L. (2003). Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun*, 71(8), 4278-4288.

- Jiang, D., Liang, J., Fan, J., Yu, S., Chen, S., Luo, Y., Prestwich, G. D., Mascarenhas, M. M., Garg, H. G., Quinn, D. A., Homer, R. J., Goldstein, D. R., Bucala, R., Lee, P. J., Medzhitov, R. & Noble, P. W. (2005). Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med*, *11*(11), 1173-1179.
- Jiang, D., Liang, J. & Noble, P. W. (2007). Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *23*, 435-461.
- Jones, D., Elloso, M. M., Showe, L., Williams, D., Trinchieri, G. & Scott, P. (1998). Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the innate immune response to *Leishmania major*. *Infect Immun*, *66*(8), 3818-3824.
- Jones, D. E., Ackermann, M. R., Wille, U., Hunter, C. A. & 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*(4), 2151-2158.
- Jones, D. E., Buxbaum, L. U. & Scott, P. (2000). IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol*, *165*(1), 364-372.
- Kane, M. M. & Mosser, D. M. (2001). The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*, *166*(2), 1141-1147.
- Kropf, P., Etges, R., Schopf, L., Chung, C., Sypek, J. & Muller, I. (1997). Characterization of T cell-mediated responses in nonhealing and healing *Leishmania major* infections in the absence of endogenous IL-4. *J Immunol*, *159*(7), 3434-3443.
- Kropf, P., Fuentes, J. M., Fahrnich, E., Arpa, L., Herath, S., Weber, V., Soler, G., Celada, A., Modolell, M. & Muller, I. (2005). Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *FASEB J*, *19*(8), 1000-1002.
- Lang, R., Rutschman, R. L., Greaves, D. R. & Murray, P. J. (2002). Autocrine deactivation of macrophages in transgenic mice constitutively overexpressing IL-10 under control of the human CD68 promoter. *J Immunol*, *168*(7), 3402-3411.

- Laskay, T., Diefenbach, A., Rollinghoff, M. & Solbach, W. (1995). Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol*, 25(8), 2220-2227.
- Laskay, T., van Zandbergen, G. & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*, 11(5), 210-214.
- Laskay, T., van Zandbergen, G. & Solbach, W. (2008). Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*, 213(3-4), 183-191.
- Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., Solbach, W. & Laskay, T. (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun*, 70(2), 826-835.
- Leal, L. M., Moss, D. W., Kuhn, R., Muller, W. & Liew, F. Y. (1993). Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol*, 23(2), 566-569.
- Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M. & Moncada, S. (1990). Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol*, 144(12), 4794-4797.
- Liew, F. Y., Xu, D. & Chan, W. L. (1999). Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunol Lett*, 65(1-2), 101-104.
- Lima, G. M., Vallochi, A. L., Silva, U. R., Bevilacqua, E. M., Kiffer, M. M. & Abrahamsohn, I. A. (1998). The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett*, 64(2-3), 145-151.
- Littman, D. R. & Rudensky, A. Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, 140(6), 845-858.
- Lohoff, M., Gessner, A., Bogdan, C. & Rollinghoff, M. (1998). The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *Int Arch Allergy Immunol*, 115(3), 191-202.

- Lopez Kostka, S., Dinges, S., Griewank, K., Iwakura, Y., Udey, M. C. & von Stebut, E. (2009). IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol*, 182(5), 3039-3046.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Lucas, M., Zhang, X., Prasanna, V. & Mosser, D. M. (2005). ERK activation following macrophage Fc γ R ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *J Immunol*, 175(1), 469-477.
- Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M. & O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4⁺ T cells. *J Immunol*, 154(10), 5071-5079.
- Maletto, B. A., Ropolo, A. S., Alignani, D. O., Liscovsky, M. V., Ranocchia, R. P., Moron, V. G. & Pistoressi-Palencia, M. C. (2006). Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood*, 108(9), 3094-3102.
- Markle, W. H. & Makhoul, K. (2004). Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician*, 69(6), 1455-1460.
- Marks, B. R., Nowyhed, H. N., Choi, J. Y., Poholek, A. C., Odegard, J. M., Flavell, R. A. & Craft, J. (2009). Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat Immunol*, 10(10), 1125-1132.
- Mathur, R. K., Awasthi, A., Wadhone, P., Ramanamurthy, B. & Saha, B. (2004). Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat Med*, 10(5), 540-544.
- Matthews, D. J., Emson, C. L., McKenzie, G. J., Jolin, H. E., Blackwell, J. M. & McKenzie, A. N. (2000). IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J Immunol*, 164(3), 1458-1462.
- McFarlane, E., Perez, C., Charmoy, M., Allenbach, C., Carter, K. C., Alexander, J. & Tacchini-Cottier, F. (2008). Neutrophils contribute to development of a protective

- immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*, 76(2), 532-541.
- Megiovani, A. M., Sanchez, F., Robledo-Sarmiento, M., Morel, C., Gluckman, J. C. & Boudaly, S. (2006). Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 79(5), 977-988.
- Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M. & Mosser, D. M. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J Exp Med*, 201(5), 747-754.
- Modolell, M., Choi, B. S., Ryan, R. O., Hancock, M., Titus, R. G., Abebe, T., Hailu, A., Muller, I., Rogers, M. E., Bangham, C. R., Munder, M. & Kropf, P. (2009). Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(7), e480.
- Mukbel, R., Petersen, C. A. & Jones, D. E. (2006). Soluble factors from *Leishmania major*-specific CD4+T cells and B cells limit *L. amazonensis* amastigote survival within infected macrophages. *Microbes Infect*, 8(9-10), 2547-2555.
- Mukbel, R. M., Patten, C., Jr., Gibson, K., Ghosh, M., Petersen, C. & Jones, D. E. (2007). Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg*, 76(4), 669-675.
- Murphy, M. L., Wille, U., Villegas, E. N., Hunter, C. A. & Farrell, J. P. (2001). IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol*, 31(10), 2848-2856.
- Murray, H. W., Lu, C. M., Mauze, S., Freeman, S., Moreira, A. L., Kaplan, G. & Coffman, R. L. (2002). Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun*, 70(11), 6284-6293.
- Nagendra, S. & Schlueter, A. J. (2004). Absence of cross-reactivity between murine Ly-6C and Ly-6G. *Cytometry A*, 58(2), 195-200.

- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6(3), 173-182.
- Nikolic, T., de Bruijn, M. F., Lutz, M. B. & Leenen, P. J. (2003). Developmental stages of myeloid dendritic cells in mouse bone marrow. *Int Immunol*, 15(4), 515-524.
- Noben-Trauth, N., Lira, R., Nagase, H., Paul, W. E. & Sacks, D. L. (2003). The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J Immunol*, 170(10), 5152-5158.
- Novais, F. O., Santiago, R. C., Bafica, A., Khouri, R., Afonso, L., Borges, V. M., Brodskyn, C., Barral-Netto, M., Barral, A. & de Oliveira, C. I. (2009). Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol*, 183(12), 8088-8098.
- Oswald, I. P., Gazzinelli, R. T., Sher, A. & James, S. L. (1992). IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol*, 148(11), 3578-3582.
- Padigel, U. M., Alexander, J. & Farrell, J. P. (2003). The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *J Immunol*, 171(7), 3705-3710.
- Padigel, U. M. & Farrell, J. P. (2005). Control of infection with *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice lacking the common gamma-chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF-beta by parasitized cells. *J Immunol*, 174(10), 6340-6345.
- Park, A. Y., Hondowicz, B. D. & Scott, P. (2000). IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J Immunol*, 165(2), 896-902.
- Pedrosa, J., Saunders, B. M., Appelberg, R., Orme, I. M., Silva, M. T. & Cooper, A. M. (2000). Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun*, 68(2), 577-583.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N. & Sacks, D. (2008). In vivo imaging reveals an

essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321(5891), 970-974.

- Prina, E., Abdi, S. Z., Lebastard, M., Perret, E., Winter, N. & Antoine, J. C. (2004). Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J Cell Sci*, 117(Pt 2), 315-325.
- Qi, H., Popov, V. & Soong, L. (2001). *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells in vivo. *J Immunol*, 167(8), 4534-4542.
- Ramer, A. E., Vanloubbeeck, Y. F. & Jones, D. E. (2006). Antigen-responsive CD4+ T cells from C3H mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* are impaired in the transition to an effector phenotype. *Infect Immun*, 74(3), 1547-1554.
- Ribechini, E., Leenen, P. J. & Lutz, M. B. (2009). Gr-1 antibody induces STAT signaling, macrophage marker expression and abrogation of myeloid-derived suppressor cell activity in BM cells. *Eur J Immunol*, 39(12), 3538-3551.
- Ribeiro-Gomes, F. L., Moniz-de-Souza, M. C., Alexandre-Moreira, M. S., Dias, W. B., Lopes, M. F., Nunes, M. P., Lungarella, G. & DosReis, G. A. (2007). Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol*, 179(6), 3988-3994.
- Ribeiro-Gomes, F. L., Otero, A. C., Gomes, N. A., Moniz-De-Souza, M. C., Cysne-Finkelstein, L., Arnholdt, A. C., Calich, V. L., Coutinho, S. G., Lopes, M. F. & DosReis, G. A. (2004). Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol*, 172(7), 4454-4462.
- Ribeiro-Gomes, F. L., Peters, N. C., Debrabant, A. & Sacks, D. L. (2012). Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog*, 8(2), e1002536.
- Romani, L., Bistoni, F. & Puccetti, P. (1997). Initiation of T-helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role of neutrophils. *Chem Immunol*, 68, 110-135.

- Ronet, C., Hauyon-La Torre, Y., Revaz-Breton, M., Mastelic, B., Tacchini-Cottier, F., Louis, J. & Launois, P. (2010). Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol*, 184(2), 886-894.
- Rousseau, D., Demartino, S., Ferrua, B., Michiels, J. F., Anjuere, F., Fragaki, K., Le Fichoux, Y. & Kubar, J. (2001). In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol*, 1, 17.
- Ruhland, A. & Kima, P. E. (2009). Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Exp Parasitol*, 122(1), 28-36.
- Salhi, A., Rodrigues, V., Jr., Santoro, F., Dessein, H., Romano, A., Castellano, L. R., Sertorio, M., Rafati, S., Chevillard, C., Prata, A., Alcais, A., Argiro, L. & Dessein, A. (2008). Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol*, 180(9), 6139-6148.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F. & Cassatella, M. A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*, 177, 195-203.
- Scharton, T. M. & Scott, P. (1993). Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med*, 178(2), 567-577.
- Scharton-Kersten, T., Afonso, L. C., Wyszocka, M., Trinchieri, G. & Scott, P. (1995). IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol*, 154(10), 5320-5330.
- Scharton-Kersten, T. & Scott, P. (1995). The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *J Leukoc Biol*, 57(4), 515-522.
- Scott, P. & Hunter, C. A. (2002). Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol*, 14(4), 466-470.

- Sher, A., Collazzo, C., Scanga, C., Jankovic, D., Yap, G. & Aliberti, J. (2003). Induction and regulation of IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunol Res*, 27(2-3), 521-528.
- Silveira, F. T., Lainson, R. & Corbett, C. E. (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(3), 239-251.
- Soehnlein, O., Zernecke, A., Eriksson, E. E., Rothfuchs, A. G., Pham, C. T., Herwald, H., Bidzhekov, K., Rottenberg, M. E., Weber, C. & Lindbom, L. (2008). Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*, 112(4), 1461-1471.
- Soong, L., Chang, C. H., Sun, J., Longley, B. J., Jr., Ruddle, N. H., Flavell, R. A. & McMahon-Pratt, D. (1997). Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol*, 158(11), 5374-5383.
- Spath, G. F. & Beverley, S. M. (2001). A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol*, 99(2), 97-103.
- Stark, M. A., Huo, Y., Burcin, T. L., Morris, M. A., Olson, T. S. & Ley, K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22(3), 285-294.
- Sunderkotter, C., Kunz, M., Steinbrink, K., Meinardus-Hager, G., Goebeler, M., Bildau, H. & Sorg, C. (1993). Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol*, 151(9), 4891-4901.
- Swihart, K., Fruth, U., Messmer, N., Hug, K., Behin, R., Huang, S., Del Giudice, G., Aguet, M. & Louis, J. A. (1995). Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. *J Exp Med*, 181(3), 961-971.

- Tacchini-Cottier, F., Zweifel, C., Belkaid, Y., Mukankundiye, C., Vasei, M., Launois, P., Milon, G. & Louis, J. A. (2000). An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol*, 165(5), 2628-2636.
- Takeuchi, D., Jones, V. C., Kobayashi, M. & Suzuki, F. (2008). Cooperative role of macrophages and neutrophils in host Antiprotozoan resistance in mice acutely infected with *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun*, 76(8), 3657-3663.
- Terabe, M., Hatabu, T., Takahashi, H., Ito, M., Onodera, T. & Matsumoto, Y. (1999a). *Leishmania amazonensis* infection in nude mice. *Exp Anim*, 48(2), 119-123.
- Terabe, M., Kuramochi, T., Hatabu, T., Ito, M., Ueyama, Y., Katakura, K., Kawazu, S., Onodera, T. & Matsumoto, Y. (1999b). Non-ulcerative cutaneous lesion in immunodeficient mice with *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitol Int*, 48(1), 47-53.
- Thalhofer, C. J., Chen, Y., Sudan, B., Love-Homan, L. & Wilson, M. E. (2011). Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infect Immun*, 79(1), 108-117.
- Tone, M., Powell, M. J., Tone, Y., Thompson, S. A. & Waldmann, H. (2000). IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol*, 165(1), 286-291.
- van Gisbergen, K. P., Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. (2005a). Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol*, 26(12), 626-631.
- van Gisbergen, K. P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. (2005b). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med*, 201(8), 1281-1292.
- van Zandbergen, G., Hermann, N., Laufs, H., Solbach, W. & Laskay, T. (2002). *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun*, 70(8), 4177-4184.

- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. & Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*, 173(11), 6521-6525.
- Vanloubbeeck, Y. F., Ramer, A. E., Jie, F. & Jones, D. E. (2004). CD4⁺ Th1 cells induced by dendritic cell-based immunotherapy in mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* do not promote healing. *Infect Immun*, 72(8), 4455-4463.
- Venuprasad, K., Banerjee, P. P., Chattopadhyay, S., Sharma, S., Pal, S., Parab, P. B., Mitra, D. & Saha, B. (2002). Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN-gamma secretion and restriction of *Leishmania* growth. *J Immunol*, 169(2), 920-928.
- Venuprasad, K., Chattopadhyay, S. & Saha, B. (2003). CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. *Hum Immunol*, 64(1), 38-43.
- Vester, B., Muller, K., Solbach, W. & Laskay, T. (1999). Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun*, 67(6), 3155-3159.
- Vieira, L. Q., Goldschmidt, M., Nashleanas, M., Pfeffer, K., Mak, T. & Scott, P. (1996). Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication. *J Immunol*, 157(2), 827-835.
- Vouldoukis, I., Becherel, P. A., Riveros-Moreno, V., Arock, M., da Silva, O., Debre, P., Mazier, D. & Mossalayi, M. D. (1997). Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur J Immunol*, 27(4), 860-865.
- Wanasen, N., MacLeod, C. L., Ellies, L. G. & Soong, L. (2007). L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infect Immun*, 75(6), 2802-2810.
- Wanasen, N., Xin, L. & Soong, L. (2008). Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int J Parasitol*, 38(3-4), 417-429.

- Wartha, F., Beiter, K., Normark, S. & Henriques-Normark, B. (2007). Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 10(1), 52-56.
- Weigle, K. & Saravia, N. G. (1996). Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol*, 14(5), 433-450.
- Weinheber, N., Wolfram, M., Harbecke, D. & Aebischer, T. (1998). Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *Eur J Immunol*, 28(8), 2467-2477.
- Xin, L., Li, K. & Soong, L. (2008). Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol Immunol*, 45(12), 3371-3382.
- Xin, L., Vargas-Inchaustegui, D. A., Raimer, S. S., Kelly, B. C., Hu, J., Zhu, L., Sun, J. & Soong, L. (2010). Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to *Leishmania* parasites. *J Immunol*, 184(12), 7047-7056.
- Yang, C. W., Strong, B. S., Miller, M. J. & Unanue, E. R. (2010). Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J Immunol*, 185(5), 2927-2934.
- Yang, Z., Mosser, D. M. & Zhang, X. (2007). Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. *J Immunol*, 178(2), 1077-1085.
- Zhang, X., Edwards, J. P. & Mosser, D. M. (2006). Dynamic and transient remodeling of the macrophage IL-10 promoter during transcription. *J Immunol*, 177(2), 1282-1288.
- Zhang, X., Goncalves, R. & Mosser, D. M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 14, Unit 14.11, 1-14.