



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MODULAÇÃO DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGO HUMANO
POR *Leishmania amazonensis* PELA INTERAÇÃO COM
NEUTRÓFILOS HUMANOS APOPTÓTICOS E NECRÓTICOS**

LILIAN MARIA REIS AFONSO

Salvador-Bahia-Brasil
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

MODULAÇÃO DA INFECCÃO DE MACRÓFAGO HUMANO
POR *Leishmania amazonensis* PELA INTERAÇÃO COM
NEUTRÓFILOS HUMANOS APOPTÓTICOS E NECRÓTICOS

LILIAN MARIA REIS AFONSO

Orientadora: Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre em
Imunologia.

Salvador – Bahia

2006

MODULAÇÃO DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGO HUMANO POR *Leishmania*
amazonensis PELA INTERAÇÃO COM NEUTRÓFILOS HUMANOS APOPTÓTICOS E
NECRÓTICOS

LILIAN MARIA REIS AFONSO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Flávia Ribeiro Gomes
Pesquisadora Visitante- Laboratório de
Biologia Imunitária do Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho - UFRJ

Dra. Olívia Bacellar
Serviço de Imunologia
HUPES

Dra. Cláudia Ida Brodskyn
Pesquisadora
CPqGM - FIOCRUZ

A Deus, guia da minha vida.

A Lindinalva, Francisco e André com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Durante este trabalho muitas pessoas tiveram participação especial. Uns no trabalho prático e estudo outros com amizade e carinho.

Lindinalva Afonso

Francisco Afonso

André Macedo

Cláudia Brodskyn

Valéria Borges

Aldina Barral

Manoel Barral

Cecília Favali

Dirceu Joaquim

Sebastião Martins

Deboraci Prates

Robson Amaro

Tatiana Moura

Patrícia Meira

Ricardo Fraga

Andréia Padre

Demais colegas do Laboratório de Imunoparasitologia e do Laboratório de Microbiologia e
Imunoregulação do CPQGM/FIOCRUZ

Dilcéia

Todos os professores do PPGIm

Este trabalho é um pouco de cada um. Agradeço muito a todos, pois sem vocês não conseguiria alcançar mais esta conquista. Muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Características Gerais da Leishmaniose.....	14
1.2 Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i>	15
1.3 Manifestações clínicas das Leishmanioses e Resposta Imune	15
1.4 Características Gerais dos Neutrófilos.....	18
1.5 Atividade Microbicida dos Neutrófilos	21
1.6 Neutrófilos e Morte Celular	23
2. JUSTIFICATIVAS	27
3. HIPÓTESE	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 Geral	28
4.2 Específico.....	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1 Cultura de Células.....	29
5.2 Cultura de <i>Leishmania</i> e Infecção de Macrófagos Humanos	30
5.3 Obtenção de Neutrófilos Apoptóticos e Necróticos	30
5.4 Co-cultura entre Macrófagos Infectados e Neutrófilos Viáveis, Apoptóticos e	

Necróticos.....	31
5.5 Identificação de Intermediários Reativos de Oxigênio.....	32
5.6 Análise Estatística	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Interação entre neutrófilos apoptóticos, viáveis e necróticos com macrófago humano infectado com <i>Leishmania amazonensis</i>	34
6.2 Papel do TGF- β e PGE ₂ na interação entre macrófagos infectados e PMN apoptótico	38
6.3 Papel do TNF- α e Elastase Neutrófila (NE) na interação entre macrófago infectado e PMN necrótico.....	42
6.4 Mecanismos de morte do parasita na interação macrófago infectado: PMN: necrótico.....	45
7. DISCUSSÃO.....	48
8. CONCLUSÃO.....	56
9. PERSPECTIVAS	56
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO 1. Manuscrito do artigo para publicação	73

RESUMO

MODULAÇÃO DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGO HUMANO POR *Leishmania amazonensis* PELA INTERAÇÃO COM NEUTRÓFILOS HUMANOS APOPTÓTICOS E NECRÓTICOS. **LILIAN MARIA REIS AFONSO**. Os neutrófilos são células que atuam na primeira linha de defesa do organismo contra patógenos e estão constitutivamente programadas para a morte celular por apoptose, sendo então, fagocitados por macrófagos, liberando mediadores anti-inflamatórios. No presente estudo, avaliamos o efeito da fagocitose de neutrófilos humanos apoptóticos e necróticos por macrófagos humanos infectados por *Leishmania amazonensis*. Os resultados indicam um aumento na taxa de infecção dos macrófagos pela *Leishmania amazonensis* assim como no número de parasitas/100 macrófagos, na presença de neutrófilos apoptóticos. Para verificar o mecanismo responsável por este fenômeno, co-cultivamos os macrófagos infectados com neutrófilos apoptóticos, na presença ou ausência de anti-TGF- β e Indometacina. Observamos que o aumento da infecção dos macrófagos na presença de neutrófilos apoptóticos foi mediado pela produção de TGF- β e PGE₂. Por outro lado, houve uma diminuição da infecção de *Leishmania amazonensis* nos macrófagos, assim como no número de parasitas/100 macrófagos, na presença de neutrófilos necróticos. Para investigar o mecanismo envolvido nesta queda na infecção co-cultivamos os macrófagos infectados e os neutrófilos necróticos na presença ou ausência de anti-TNF- α e anticorpo anti-elastase neutrofílica. Os resultados mostram que a diminuição observada na infecção dos macrófagos foi mediada pelo TNF- α e Elastase Neutrofílica (NE). Buscando entender o mecanismo de morte dos parasitas verificamos a produção de óxido nítrico nos

sobrenadantes das culturas de neutrófilos necróticos e macrófagos infectados. Não houve produção de óxido nítrico em nenhuma das condições. Deste modo adicionamos à cultura catalase e verificamos que a infecção dos macrófagos foi aumentada. Assim a morte dos parasitas parece ser mediada por espécies de oxigênio reativo. O entendimento desta fase inicial da resposta contra a *Leishmania* pode ser de extrema importância para futuras intervenções terapêuticas ou imunoproláticas contra esta doença.

Palavras-Chave: Neutrófilos; Leishmania; Apoptose; Necrose.

ABSTRACT

MODULATION OF MACROPHAGE INFECTION BY *Leishmania amazonensis* THROUGH OF CLEARANCE OF APOPTOTIC OR NECROTIC HUMAN NEUTROPHILS. **LILIAN MARIA REIS AFONSO.** The neutrophils are the first cells in the body defense against pathogens and are constitutively programmed to cell dead by apoptosis. They are uptaken by macrophages, which release anti-inflammatory mediators. In the present study, we evaluated the effect of human apoptotic and necrotic neutrophils phagocytosis by *Leishmania amazonensis* infected human macrophages. The results show an increase in macrophage infection by *Leishmania amazonensis*, as well as in the parasite number/ 100 macrophage in the presence of apoptotic neutrophil. In order to figure out the mechanism responsible for this effect, we cultured *Leishmania amazonensis*-infected macrophage in the presence or absence of apoptotic neutrophil with the addition of α -TGF- β and Indomethacin. The results showed that infection increase was mediated by TGF- β production and PGE₂. In the other hand, there is a decrease in macrophage infection as well as in parasite number/ 100 macrophage, in the presence of necrotic neutrophil. Cultures of the infected macrophage in the presence of necrotic neutrophil with the addition of α -TNF- α and of neutralizing antibody to neutrophilic elastase were performed. The results showed that this infection decrease was mediated by TNF- α and NE production. To understand the mechanism of parasite killing by macrophages, we measured nitric oxide production in supernatante cultures of *Leishmania amazonensis*-infected macrophage and necrotic neutrophils. We did not observe any NO production in this experimental condition. We also added to the culture catalase and verified an increase in the macrophage infection. The results show that parasite killing might be

mediated by reactive oxygen intermediates (ROI), but not by nitric oxide. The understanding of this early phase of response against *Leishmania* might be very important to future therapeutical interventions against this disease.

Keywords: Neutrófilos; Leishmania; Apoptose; Necrose.

LISTA DE ABREVIATURAS

APOP-	Apoptótico
CMSP -	Células Mononucleares do Sangue Periférico
COX-	Ciclooxigenase
DMEM-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
IFN- γ	Interferon gama
IL-4-	Interleucina 4
IL-8-	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
H ₂ O ₂ -	Peróxido de Hidrogênio
LCD –	Leishmaniose Cutâneo Difusa
LCL -	Leishmaniose Cutâneo Localizada
LCM -	Leishmaniose Cutâneo Mucosa
LD –	Leishmaniose Disseminada
LV –	Leishmaniose Visceral
LPS-	Lipopolissacarídeo
MIP2-	Macrophage Inflammatory Protein 2
MIP1 β -	Macrophage Inflammatory Protein 1 β
MPO -	Mieloperoxidase
NE -	Elastase Neutrófila
Necro-	Necrótico
NF κ B-	Fator Nuclear de Transcrição- κ B

NO-	Óxido Nítrico
iNOS-	Óxido Nítrico Sintetase Induzível
ODC-	Ornitina Descarboxilase
PAF-	Fator Ativador de Plaqueta
PGE ₂ -	Prostaglandina E ₂
PMN -	Polimorfos Nucleares Neutrófilos
ROI-	Intermediário Reativo de Oxigênio
TGF-β?	Fator Transformador do Crescimento beta
TNF-α?	Fator de Necrose Tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito dos neutrófilos apoptóticos e necróticos na infecção de macrófago por <i>Leishmania amazonensis</i>	33
Figura 2: Efeito da célula Jurkat apoptótica e necrótica na infecção de macrófago por <i>L. amazonensis</i>	34
Figura 3: Papel do TGF β na infecção de macrófago em presença de neutrófilo apoptótico.....	37
Figura 4: Efeito da PGE $_2$ na infecção de macrófagos em presença de neutrófilo apoptótico.....	38
Figura 5: Efeito do TNF- α na infecção de macrófago em presença de neutrófilos necróticos.....	40
Figura 6: Papel da Elastase neutrofílica humana na infecção de macrófago em presença de neutrófilo necrótico	41
Figura 7: Mecanismo de morte dos parasitas no interior dos macrófagos em presença de PMN necrótico.....	43

Lista de Anexos

Anexo 1- Manuscrito do artigo para publicação	71
--	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais da Leishmaniose

Transmitida pela picada da fêmea do flebótomo, as leishmanioses constituem um grupo de doenças parasitárias causada por uma variedade de espécies parasitas do gênero *Leishmania*, estando globalmente espalhadas. Atualmente, está estimado em 12 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo. São encontradas em grande parte da América do Sul e Central, África, Ásia e Mediterrâneo (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/disease/leish/deaful.htm>, acesso em 04/09/2005).

O número de novos casos de leishmaniose cutânea a cada ano está ao redor de 1,5 milhões, enquanto que a leishmaniose visceral apresenta 500,000 mil novos casos por ano (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/disease/leish/deaful.htm>, acesso em 04/09/2005). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, em 1994 foram registrados casos de Leishmaniose tegumentar americana em 1861 municípios do país e em 1999, ocorreu uma expansão da doença, sendo esta notificada em 2036 municípios (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde).

As áreas atingidas pela leishmaniose estão muito relacionadas ao desenvolvimento. Estas áreas sofrem uma migração rural-urbana massiva e projetos agroindustriais que trazem moradores urbanos para dentro de áreas rurais endêmicas. Além disso, o desenvolvimento de projetos sem avaliação do impacto ambiental e o desmatamento também contribuem para a expansão da leishmaniose (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/disease/leish/deaful.htm>, acesso em 04/09/2005).

1.2 Ciclo de vida do parasita *Leishmania*

O ciclo de vida do parasita inicia-se quando a fêmea do flebótomo parasitada faz seu repasto sangüíneo. Nesta alimentação, formas promastigotas (forma infectiva) do parasita *Leishmania* são introduzidas no hospedeiro humano. Os flebótomos são primariamente infectados por animais reservatórios. Dentro do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas do parasita são fagocitadas por macrófagos, dentro dos quais transformam-se em formas amastigotas (forma intracelular), reproduzindo-se por fissão binária. Elas aumentam em número na célula levando à sua ruptura e infecção de outros fagócitos. O hospedeiro vertebrado infectado é picado por uma outra fêmea de flebótomo. Durante esta alimentação sangüínea os parasitas infectam o vetor. Dentro deste, as formas amastigotas do parasita transformam-se em promastigotas. Quando este flebótomo realizar outro repasto sangüíneo, poderá infectar um novo hospedeiro vertebrado, continuando o ciclo (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/disease/leish/deaful.htm>, acesso em 04/09/2005).

1.3- Resposta Imune e Manifestações Clínicas das Leishmanioses

Por ser um organismo intracelular obrigatório, o principal mecanismo de defesa contra a leishmania é a produção de IFN- γ , que ativa os macrófagos levando-os à produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SCOTT e cols., 1988; SCOTT e cols., 1983; SHER e cols., 1983). Em camundongos, a resistência ao parasita está ligada à produção de uma resposta do tipo Th1 com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2. Enquanto que a resposta do tipo 2 com produção de IL-4 e IL-5, está associada à susceptibilidade à infecção (SCOTT e

cols., 1988; SCOTT e cols., 1989). No ser humano o controle da infecção também é mediado por células, no entanto a resposta imune é mais complexa. A deficiência da resposta imune protetora está associada à proliferação do parasita. Já um resposta tipo 1 muito intensa provoca lesão tecidual (RIBEIRO-DE-JESUS e cols., 1998)

As leishmanioses apresentam duas formas clínicas principais: Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT). A LV também conhecida como *Kalazar* é a mais severa forma da doença. Se não tratada, pode ser fatal. É caracterizada por acessos irregulares de febre, perda de peso, anemia e crescimento do baço e fígado. Nesta forma clínica, os cães constituem os principais reservatórios dos parasitas (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/disease/leish/deaful.htm>, acesso em 04/09/2005).

No Novo Mundo, a LT é causada por muitas espécies do parasita sendo os principais a *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania guyanensis* (LAINSON e cols., 1987). A LT apresenta muitas manifestações clínicas sendo as principais a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM), Leishmaniose Disseminada (LD) e Leishmaniose Cutâneo Difusa (LCD).

a) Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL). No Brasil, esta forma da doença é ocasionada principalmente pelas espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Pode produzir grande número de úlceras de pele nas partes expostas do corpo, tais como, face, pernas e braços causando séria deficiência e deixando o paciente permanentemente com cicatrizes. A leishmaniose cutânea é uma zoonose (quando a transmissão ocorre a partir de outros animais para os seres humanos). Os animais mais importantes na transmissão da leishmaniose cutânea

para os seres humanos são os roedores. Os seres humanos tornam-se hospedeiros quando adquirem a infecção ao penetrarem em áreas florestais, ou devido à aproximação de reservatórios selvagens ao peridomicílio (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/disease/leish/deaful.htm>, acesso em 04/09/2005).

As células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LCL secretam grande quantidade de IFN- γ e TNF- α e baixos níveis de IL-5 e IL-10 quando são estimuladas com antígeno solúvel de leishmania (SLA) (BACELLAR e cols., 2002). Entretanto existem evidências de que a resposta inflamatória é responsável pelo aparecimento das úlceras (MACHADO e cols., 2002; RIBEIRO-DE-JESUS e cols., 1998).

b) Leishmaniose Cutâneo -Mucosa (LCM). No Brasil, ocorre em 1 a 10% dos casos de pacientes infectados com *L. braziliensis* estando a *L. amazonensis* pouco relacionada com esta manifestação (BARRAL e cols., 1991). Produz lesões que podem levar a destruição extensiva e desfiguração das cavidades mucosas do nariz, boca e garganta (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/disease/leish/deaful.htm>, acesso em 04/09/2005). Neste tipo da doença as CMSP produzem uma quantidade muito maior de IFN- γ e TNF- α do que a observada na LCL (BACELLAR e cols., 2002).

c) Leishmaniose Cutâneo Difusa (LCD). É uma manifestação rara no Brasil sendo decorrente da infecção causada pela *L. amazonensis* (CARVALHO e cols., 1994; COSTA e cols., 1992). Nunca cura espontaneamente e tende a reincidência após o tratamento (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/disease/leish/deaful.htm>, acesso em 04/09/2005). As lesões são nodulares, em grande número e disseminadas pelo

corpo. (BITTENCOUR e cols., 1990). As células de pacientes com LCD apresentam expressão alta de RNAm para IL-10 e IL-4 e baixa expressão para IFN- γ durante a fase ativa da doença. (BOMFIM e cols., 1996). A presença das úlceras e as deformações causadas por estas doenças podem levar os pacientes ao desenvolvimento de sérios problemas sociais. (World Health Organization, disponível em <http://www.who.int/tdr/disease/leish/deaful.htm>, acesso em 04/09/2005).

d) Leishmaniose Disseminada (LD). É uma forma de leishmaniose recente no Nordeste do Brasil, causada na maioria dos casos pela *Leishmania braziliensis* (CARVALHO e cols., 1994). Pacientes com esta manifestação apresentam múltiplas lesões espalhadas pelo corpo, que podem ser nodulares ou ulceradas (CARVALHO e cols., 1994). Neste tipo da doença ocorre uma produção baixa de IFN- γ e TNF- α , no entanto esta produção é maior que a observada na LCD (CARVALHO e cols., 1994).

As diferentes manifestações clínicas da leishmaniose dependem de complexas interações que abrangem, desde a característica infectiva da espécie de *Leishmania sp.* até o estado imunológico do hospedeiro (PEARSON e cols., 1996).

1.4 Características Gerais dos Neutrófilos

Os polimorfonucleares neutrofílicos (PMN) são componentes do sistema imune inato. São células altamente especializadas caracterizadas pelo núcleo multilobado e citoplasma granular. Atuam na primeira linha de defesa contra infecções bacterianas e fúngicas (ZYCHLINSKY e cols., 2003). Sua origem é na medula óssea a partir de células

tronco mielóides e são lançados na circulação onde possuem uma meia vida curta (8-20 horas) (EDWARD, 1994).

Após estímulos com mediadores inflamatórios, as células do tecido vascular adjacente aos sítio de infecção expressam moléculas de P-selectina, que por sua vez ligam-se à superfície do PMN, promovendo o rolamento das células. O endotélio estimulado por citocinas secreta substâncias ativadoras de PMN, como o Fator Estimulador de Plaquetas (PAF), Interleucina-8 (IL8), os quais mobilizam as vesículas secretórias dos PMN, aumentando a interação com o endotélio, contribuindo na sua migração (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003). O tecido murino infectado por *L. major* aumenta a expressão de quimiocinas como KC, uma quimiocina que é homóloga a IL-8 em seres humanos, (MULLER e cols., 2001) e também de MIP2, que são recrutadoras de neutrófilos (TEIXEIRA e cols., 2006). Além do endotélio, alguns parasitas, como o protozoário *Leishmania*, são capazes de atrair neutrófilos para o sítio de infecção pela secreção de fator quimiotático (*Leishmania* Chemotactic Factor, LCF) (ZANDBERGEN e cols., 2002). Muito da atividade quimiotática da *Leishmania* foi devida a fração do LCF cujo tamanho está entre 10 e 50 KDa (ZANDBERGEN e cols., 2002). A *Leishmania* também é capaz de induzir a secreção de IL-8 pelos neutrófilos, ampliando a sua capacidade quimiotática para os PMN (ZANDBERGEN e cols., 2002).

Os neutrófilos, assim como os macrófagos, são fagócitos profissionais e desta forma eliminam patógenos e restos celulares. Os fagócitos estão equipados com receptores especializados em reconhecer seus alvos, o que vai mediar a internalização e destruição do patógeno (LEE e cols., 2003).

Quando os PMN encontram com um patógeno, ocorre ativação dos seus mecanismos microbicidas dependentes ou não de oxigênio. Os fagossomos nos PMN adquirem atividade microbicida através da fusão com vesículas e grânulos secretórios, que contêm um arsenal poderoso e diversificado de enzimas proteolíticas, peptídeos microbicidas assim como, proteínas ligadas à membrana (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003). São reconhecidas quatro categorias de grânulos neutrofílicos:

1- Grânulos Primários ou Azurofílicos: contêm enzimas como a mieloperoxidase (MPO), α -defensinas, proteína ligada à membrana (CD63) e serina proteases. A MPO reage com o peróxido de hidrogênio induzindo a formação do ácido hipocloroso que ataca a membrana do patógeno. As α -defensinas são as maiores constituintes deste grânulo. Têm atividade microbicida contra bactérias, fungos, vírus envelopados e protozoários pela formação de poros nas suas membranas. Além disso, induz quimiotaxia para células T CD4+ e CD8+ e monócitos, o que amplifica a resposta inflamatória e providencia uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa. Já as serina proteases, como a proteinase 3, catepsina-G e elastase, têm atividade proteolítica contra uma variedade de componentes da matriz extracelular, ativação de células endoteliais, epiteliais, macrófagos, linfócitos e plaquetas (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003). A elastase neutrofílica é importante na estimulação de macrófagos para a produção de citocinas. FADOK e cols, (2001) demonstraram que o lisado de PMN induz a secreção de TNF- α pelos macrófagos e que a adição de anti-elastase inibe esta secreção.

2- Grânulos Secundários ou Específicos: contêm substâncias como a lactoferrina que apresenta atividade contra muitas bactérias Gram – positivas e negativas, pois impede o seu crescimento pelo seqüestro de ferro (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

3- Grânulos Terciários ou Gelatinosos: contêm gelatinases que tem a função de degradar a matriz extracelular durante o extravasamento e diapedese (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

4- Vesículas Secretórias: contêm uma reserva de receptores associados à membrana, necessários para as fases iniciais da resposta inflamatória. São eles: β_2 -integrina, CR1, fMLP-receptor, Fc γ IIIR e CD14 (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

1.5 Atividade Microbicida dos Neutrófilos

Os neutrófilos ativados apresentam modificações na expressão gênica que se reflete na produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de superfície (ELLIS & BEAMAN, 2004). O tratamento de PMN com IFN- γ diminui a secreção de IL-8 e aumenta a de TNF- α e IL-1 β , ou seja, o tratamento diminui a produção de quimiocinas recrutadoras de PMN e aumenta a secreção daquelas que atraem componentes da imunidade adquirida, como por exemplo, IP-10, MIG e ITAC todas quimioatraentes para células T ativadas (ELLIS & BEAMAN, 2004). PMN estimulados com LPS, IL-12 e TNF- α secretam baixos níveis de IFN- γ . No entanto, experimentos *in vivo* demonstraram a secreção de IFN- γ pelos PMN induzida por uma série de patógenos como *Nocardia asteróides*, *Salmonella typhimurium*, *Leishmania major* e *Plasmodium berhei* (ELLIS & BEAMAN, 2004).

A fagocitose de *Shigella flexneri* pelos PMN ativa defesas independentes de oxigênio. Ao ser fagocitada, a bactéria é destruída pela ação da elastase neutrofílica derivada dos grânulos azurofílicos. Já a *Legionella pneumophila* é morta pela ação oxidante dirigida pela MPO, enquanto que o fungo *Histoplasma capsulatum* é destruído por mecanismos que dependem de substâncias como catepsina G e α -defensinas. (ALLEN e cols., 2003).

IFN- γ derivado de PMN funciona para o controle do crescimento do parasita *Leishmania*. Além disso, estimula a migração de células T e induz a secreção de citocinas (VENUPRASAD e cols., 2003). Neste sistema a produção de IFN- γ envolve a ligação do CD28 expresso na superfície dos PMN com B7 na superfície dos macrófagos infectados (VENUPRASAD e cols., 2002).

TNF- α é capaz de induzir a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*, o que foi demonstrado pelo bloqueio da expressão de iNOS após o tratamento destes camundongos com anti-TNF- α . Entretanto o TNF- α não participa da indução de iNOS em PMN, uma vez que o tratamento com anti-TNF- α não bloqueia a expressão de iNOS em PMN nestes mesmos camundongos (FONSECA e cols., 2003). Isso indica um papel dos PMN no controle inicial da infecção causada pela *Leishmania major* em camundongos C57BL/6 (FONSECA e cols., 2003).

Entretanto existem controvérsias quanto à participação dos neutrófilos no processo de cura de animais infectados com *Leishmania*. ROUSSEAU e cols. (2001) demonstraram a participação de PMN no controle inicial da infecção por *L. infantum* em camundongos BALB/c que tiveram a carga parasitária do baço aumentada quando PMN foram

depletados destes camundongos. LIMA e cols. (1998) demonstraram que tanto camundongos resistentes quanto susceptíveis depletados de PMN e infectados com *L. major* tinham aumento na carga parasitária na lesão e no linfonodo. Entretanto, TACCHINI-COTIER e cols. (2000) mostraram que BALB/c depletado de PMN apresenta uma lesão menor que a observada no controle. Os autores propuseram que os PMN, quando depletados, apresentam um papel imunomodulatório durante a infecção por *L. major* inibindo a produção inicial de IL-4. (TACCHINI-COTIER e cols., 2000).

Outro mecanismo de morte de patógenos induzido pelos PMN ocorre pela formação de armadilhas extracelulares. Após sua ativação, os PMN são capazes de produzir estas armadilhas que degradam os fatores de virulência e matam bactérias, são as “Neutrophils Extracellular Traps” (NET). Nestas armadilhas, os neutrófilos liberam grânulos de proteínas e cromatina que juntos formam uma rede de fibras extracelular capazes de se ligar a bactérias. Os “Traps” foram encontrados *in vivo* em infecções como apendicite em seres humanos e shigelose em coelhos (BRINKMANN e cols., 2004).

1. 6 Neutrófilos e morte celular

Os neutrófilos são células que apresentam um curto ciclo de vida e entram em apoptose, um processo crítico para o sucesso da resolução da inflamação (SAVILL e cols., 1995). Uma variedade de agentes pode modular a apoptose de neutrófilos e eles atuam através de múltiplos receptores e complexos caminhos de sinalização (AKGUL e cols., 2001).

A apoptose é um processo intensamente controlado de morte celular, que tem importantes implicações no desenvolvimento, na defesa do hospedeiro e na regulação da resposta imune (LEONARDO e cols., 1999; KRAMMER, 2000; SAVILL & FADOK, 2000).

Na apoptose, a célula retrai o citoplasma e grandes regiões de cromatina se agregam e condensam, formando o núcleo picnótico. A membrana plasmática permanece íntegra e as organelas bem preservadas. Mais tardiamente, a célula pode se fragmentar, originando os corpos apoptóticos. A clivagem do DNA na cromatina nuclear condensada em células apoptóticas é um dos parâmetros bioquímicos característicos, facilmente observado em gel de agarose (STRASSER e cols., 2000).

A sinalização para apoptose pode ser deflagrada por diversos estímulos. Existem duas vias apoptóticas: uma que envolve a superfamília dos receptores de morte, incluindo receptor de TNF α e CD95 (Fas); e outra que passa pela mitocôndria. Entretanto essas vias convergem para uma maquinaria de execução de morte comum, com a ativação da enzima efetora neste processo, a caspase-3 (HENGARTNER, 2000).

A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos envolve o reconhecimento e interação de uma série de receptores de superfície de ambas as células (SAVILL.& FADOK, 2000, LOPES e cols., 2000). Na célula apoptótica, a exposição de fosfatidilserina no folheto externo na membrana plasmática é reconhecida precocemente, como sinal para fagocitose (HENGARTNER, 2000). O reconhecimento de neutrófilos apoptóticos envolve receptores de ACAMPs (“apoptotic cell associated molecular patterns”) (FRANC e cols., 1999).

Macrófagos e células dendríticas podem ser funcionalmente modificados após a interação com células apoptóticas, resultando em distintas respostas biológicas (LOPES e cols., 2000). A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos humanos induz mecanismos antiinflamatórios e supressores, associados à produção de TGF- β , PGE₂ e PAF (FADOK e cols., 1998).

Mecanismos supressores induzidos pela captação de células apoptóticas por fagócitos profissionais têm sido sugeridos como estratégias de escape para alguns patógenos intracelulares (LOPES e cols., 2000). A infecção por *T. cruzi* produz uma intensa morte celular induzida por ativação (“Activation-Induced Cell Death” /AICD) de linfócitos T CD4⁺ (LOPES e cols., 1995). O ambiente supressivo gerado pela fagocitose de células apoptóticas induz a proliferação dos patógenos nas células do hospedeiro, como acontece com *Coxiella burnetti* (ZAMBONI e cols., 2003), HIV-1 (LIMA e cols., 2002), *Trypanozoma cruzi* (FREIRE-LIMA e cols., 2000) e *Leishmania major* (RIBEIRO-GOMES e cols., 2004). Outro exemplo é a bactéria *Fusobacterium nucleatum* que induz apoptose em células mononucleares e em PMN sugerindo um mecanismo para explicar a imunossupressão na doença periodontal (JEWET e cols., 2000).

Recentemente, foi demonstrado que *Leishmania major* retarda, mas não impede a apoptose espontânea dos PMN (AGA e cols., 2002). O mesmo grupo mostrou posteriormente que a *Leishmania* sobrevive no interior do PMN sob forma de promastigota sendo este PMN infectado capaz de secretar MIP1 β , recrutando assim monócitos para o sítio de infecção. (ZANDBERGEN e cols., 2004). Desta maneira os macrófagos poderiam mais tarde fagocitar

o PMN infectado sem despertar suas atividades de defesa contra o parasita. Eles denominaram este mecanismo de “Cavalo de Tróia” (LASKAY e cols., 2003).

PMN mortos e fagocitados por macrófagos apresentam dois comportamentos, que dependem do genótipo do hospedeiro (RIBEIRO-GOMES e cols., 2004). Em camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção por *Leishmania major*, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos leva a um aumento de sua carga parasitária em um mecanismo dependente da secreção de TGF- β e PGE₂. Já em camundongos C57BL/6 ocorre um evento contrário, diminuição da carga parasitária de maneira dependente de TNF- α e elastase neutrofílica (RIBEIRO-GOMES e cols., 2004).

Na necrose, ao contrário da apoptose, existe grande aumento do volume celular, levando ao rompimento das organelas e da membrana plasmática, e conseqüente extravasamento do conteúdo intracelular liberando uma série de enzimas hidrolíticas, que desencadeiam processos inflamatórios agudos (STRASSER e cols., 2000).

Células apoptóticas que não são removidas pelos fagócitos entram em um processo de necrose secundária com destruição da célula. (SAVILL e cols., 2002). Macrófagos que fagocitem células neste estado liberam mediadores pro-inflamatórios. (SAVILL e cols., 2002). Proteases dos grânulos dos neutrófilos, principalmente a elastase neutrofílica (NE), tem a capacidade para estimular a produção de MIP-2, IL-8, TNF- α e IL-10 por macrófagos humanos (FADOK e cols., 2001).

TNF- α está associado à resistência contra muitos patógenos. *In vitro*, TNF- α está envolvido na indução de óxido nítrico que contribui para a atividade microbicida de macrófagos contra *L major* (LIEW e cols., 1990) e *T cruzi* (SILVA e cols., 1995). A elastase

neutrofílica também está envolvida no tráfico de leucócitos, pois altera a atividade quimiotática associada ao endotélio (RAO e cols., 2004), principalmente da CXCL12 ou fator α derivado de célula estromal (DCF-1 α) (Rao e cols 2004). Além disso, a NE e a catepsina G são capazes de ativar a quimerina que é um fator quimioatraente para células apresentadoras de antígeno (WITTAMER e cols., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Tegumentar apresenta uma série de manifestações clínicas que dependem da resposta imune montada contra o parasita (CARVALHO e cols., 2005). Assim, na Leishmaniose Tegumentar (Cutânea Localizada e Mucosa) ocorre alta produção de IFN- γ e TNF- α enquanto que na Leishmaniose Difusa observa-se baixa produção, ou ausência, de mediadores pró-inflamatórios. (CARVALHO e cols., 2005).

Dados demonstrados anteriormente indicam que os PMN são as primeiras células a chegarem ao sítio de infecção. Entretanto, estas células apresentam um ciclo de vida muito curto e logo entram em apoptose espontânea. Trabalhos existentes na literatura têm demonstrado que a remoção de células apoptóticas leva à secreção de substâncias supressoras da resposta imune. No entanto, efeito oposto é observado para a remoção de células necróticas. Portanto, torna-se relevante verificar o papel dos neutrófilos na infecção pela *Leishmania*, como uma maneira de melhor entender a patogênese da doença logo nos seus momentos iniciais.

3. HIPÓTESE

A presença de neutrófilos apoptóticos e necróticos humanos aumenta e diminui, respectivamente, a infecção de macrófagos humanos pela *Leishmania amazonensis*

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Investigar o papel da fagocitose dos neutrófilos humanos apoptóticos e necróticos na infecção de macrófagos humanos por *Leishmania amazonensis*.

4.2 Específico

4.2.1 Verificar a consequência da ingestão de neutrófilos humanos apoptóticos e necróticos na infecção e na carga parasitária de macrófagos humanos por *Leishmania*.

4.2.2 Identificar os mediadores liberados pelos macrófagos infectados após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos e necróticos, tais como citocinas e PGE₂.

4.2.3 Verificar a participação dos intermediários reativos de oxigênio (ROI) na infecção pela *Leishmania amazonensis* nas co-culturas entre macrófagos e neutrófilos apoptóticos e necróticos

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cultura de células

Sangue de doadores normais foi obtido a partir de voluntários do Hemocentro do Estado da Bahia. Foram utilizados 18 doadores distribuídos da seguinte forma: 7 para os experimentos com neutrófilos apoptóticos, 5 para os experimentos com neutrófilos necróticos 4 para os experimentos com células controle Jurkat e 2 para os experimentos de mecanismo de morte dos parasitas. Para obtenção dos neutrófilos humanos, o sangue coletado passou por um gradiente com o meio Polymorphoprep (Robbins Scientific Corporation, Sunnyvale, CA). O sangue foi centrifugado por 30 minutos a 300 X g em temperatura ambiente. Após a centrifugação, duas bandas de células são detectáveis. A primeira banda é constituída de células mononucleares e a segunda banda é formada por polimorfonucleares, caracteristicamente neutrófilos. As células foram então coletadas e lavadas três vezes com salina, em temperatura ambiente por 10 minutos a 200 X g.

Os macrófagos humanos foram obtidos a partir do gradiente com o meio Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), centrifugando-se por 30 minutos a 300 X g em temperatura ambiente. Após a centrifugação uma banda de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) é visualizada. Estas células foram coletadas e lavadas três vezes com salina a 4°C a 200 X g. As células foram ressuspensas em uma concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI- 1640 (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Em seguida foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços (Corning Incorporation, Costar, NY) contendo no fundo uma lamínula de 13 cm de diâmetro e incubadas a 37° C, 5% CO₂ por 30 minutos. Células não aderentes foram removidas da placa e as células aderentes foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Hyaclone, Ogden,

Utha), 2 mM/mL de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) por 7 dias.

5.2 Cultura de *Leishmania* e infecção dos macrófagos humanos

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/87/BA125) foram cultivadas em meio DMEM (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), 2 mM/mL de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) a 27°C até a fase estacionária. No sétimo dia de cultura, os macrófagos foram infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 2:1 parasitas por célula em meio RPMI 1640 a 37°C, 5% CO₂ por 4 horas. Após este período, os poços foram lavados com salina para remover os parasitas extracelulares.

5.3 Obtenção de neutrófilos apoptóticos e necróticos

Os neutrófilos obtidos após o gradiente de centrifugação foram divididos em três partes. A primeira parte foi exposta a luz ultravioleta (245nm) por 10 minutos em meio RPMI 1640 sem soro. Após este período, as células foram cultivadas por 2 horas em estufa a 37°C, 5% de CO₂. Desta maneira foi obtido em media 70-80% de apoptose das células, a qual foi verificada pela análise por microscopia óptica de amostras citocentrifugadas das células onde foi observada a condensação e em alguns casos a fragmentação do núcleo multilobado do neutrófilo. Além disso, a apoptose também foi verificada pela marcação com anexina V pela citometria de fluxo. Foram consideradas apoptóticas as células que foram anexina V positivas e PI negativas, demonstrando que não havia rompimento da membrana das células testadas.

Na segunda parte dos neutrófilos obtidos, foi induzida a necrose. As células foram, congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas a 56°C. Este procedimento foi repetido por 10 ciclos. A necrose foi testada por microscopia óptica onde todas as células mostraram-se lisadas.

A terceira parte dos neutrófilos constitui o grupo das células viáveis e não sofreram nenhum tratamento após o gradiente de separação. Para todas as condições foi utilizada a proporção de 3:1 neutrófilos por macrófago em um total de 15×10^5 neutrófilos por poço.

Foi utilizada como controle a célula de linhagem linfocitária Jurkat. Estas células foram submetidas aos mesmos tratamentos experimentais que os neutrófilos para indução de apoptose e necrose.

5.4 Co-cultura entre macrófagos infectados e neutrófilos viáveis, apoptóticos e necróticos.

Macrófagos infectados foram co-incubados com neutrófilos viáveis, apoptóticos e necróticos em meio RPMI suplementado com 1% Nutridoma-SP (Roche, Indianapolis, IN), 2 mM/mL de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) por 72 horas. Após este período os poços foram lavados com salina e as lamínulas fixadas com metanol por 20 minutos e coradas com Hematoxilina-Eosina. Para determinar a taxa de infecção dos macrófagos foram contadas 400 células por condição e em duplicata de lamínulas. A carga parasitária dos macrófagos foi determinada pela contagem do número de amastigotas no interior de cada célula infectada encontrada na contagem de 400 células em duplicata das lamínulas nas diferentes condições testadas.

Em alguns experimentos, os macrófagos infectados foram co-incubados com neutrófilos apoptóticos e necróticos em presença de anticorpos neutralizantes: 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of anti-TGF β_1 humano - (R&D Systems, Minneapolis, MN), 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-TNF α humano (R&D Systems, Minneapolis, MN), 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Isotipo controle IgG1 de camundongo purificado (BD-Pharmingen), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anti-elastase neutrofílica humana (Calbiochem), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de controle anti-IgG de coelho (R&D systems Minneapolis, MN), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antipaina (Sigma-Aldrich) e 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de Indometacina (Sigma-Aldrich).

5.5 Identificação de intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico

Nas co-culturas de macrófagos infectados e neutrófilos necróticos, foram realizados testes para detectar a presença de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Foi realizado o teste de Griess para detecção de óxido nítrico nas culturas. Os experimentos foram realizados em placas de 96 poços e fundo chato (NUNC Brand Products, DK). As soluções padrões de NaNO₂ (Sigma, St Louis MO USA) foram submetidas a diferentes diluições (1:2 - 100 μM , 1:4 - 50 μM , 1:8 - 25 μM , 1:16 - 12,5 μM , 1:32 - 6,25 μM , 1:64 - 3,125 μM , 1:128 - 1,6 μM e 1:256 - 0,8 μM). Tanto os padrões quanto o branco, foram preparados em RPMI com 10%SBF. Um volume final de 100 μL destas soluções foi dispensado por poço. As outras colunas foram reservadas para as amostras e cada poço recebeu 100 μL da mesma. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Após preparo da placa, 100 μL de reagente de Griess (solução 1:1 de Sulfanilamida 1% em CH₃COOH 30% e N-(1-Nafitil)etilenodiamina 0,1% em CH₃COOH 60%) (Sigma, St Louis MO USA), misturados imediatamente antes do uso, foram dispensados

a cada poço, seguindo-se leitura em espectrofotômetro (Emax microplate reader molecular Devices, Sunnyvale, CA), usando filtro de comprimento de onda de 560nm. Apenas os níveis de nitrito foram mensurados.

Foi utilizado também 1 mM do inibidor da Óxido Nítrico Sintase (NOS), N_w-Nitro Larginina, L-NNA (Sigma), para verificar a participação do NO na morte dos parasitas nas co-culturas entre macrófagos e neutrófilos necróticos.

Além do teste de Griess utilizamos a catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio, para verificar a participação de intermediários reativos e oxigênio (ROI) na morte da *Leishmania* pelos macrófagos. Foi adicionado na co-cultura, ao mesmo tempo em que os neutrófilos, 1000U/ mL de catalase (Sigma –Aldrich). Após 72 horas os poços foram lavados, as lamínulas coradas com Hematoxilina-Eosina e a taxa de macrófagos infectados determinada por microscopia óptica.

5.6 Análise estatística.

A análise estatística foi realizada, utilizando-se o programa GraphPad-Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). As comparações foram feitas utilizando-se o teste pareado e não paramétrico de Wilcoxon. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Interação entre neutrófilos apoptóticos, viáveis e necróticos com macrófago humano infectado com *Leishmania amazonensis*.

Para verificar o papel dos neutrófilos (PMN) na infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, cultivamos os macrófagos em presença de PMN viáveis, apoptóticos e necróticos. Nossos resultados demonstram que em presença de PMN apoptóticos ocorre um aumento na taxa de infecção do macrófago ($12,57 \pm 2,225$ para $30,29 \pm 4,231$, $p < 0,05$) (Fig. 1A) e também na sua carga parasitária ($34,0 \pm 4,583$ para $116,4 \pm 24,98$, $p < 0,05$) (Fig. 1B) de forma significativa. Na presença de PMN necróticos ocorre um efeito inverso, há uma diminuição da taxa de infecção ($12,57 \pm 2,225$ para $6,429 \pm 2,760$, $p < 0,05$) (Fig. 1A) e da carga parasitária ($34,0 \pm 4,583$ para $14,57 \pm 6,949$, $p < 0,05$) (Fig. 1B) dos macrófagos. Não houve alteração na taxa de infecção ($12,57 \pm 2,225$ para $13,00 \pm 3,055$) nem na carga parasitária ($25,00 \pm 3,266$) dos macrófagos em presença dos PMN viáveis. Para verificar se os efeitos observados acima foram devido à interação específica entre macrófago e PMN, realizamos os mesmos experimentos com as células de linhagem linfocitária Jurkat. Os resultados obtidos demonstram um aumento significativo na taxa de infecção dos macrófagos na presença de Jurkat necrótica ($11,75 \pm 6,344$ para $42,25 + 15,65$, $p < 0,05$) e apenas uma tendência de aumento desta infecção na presença Jurkat apoptótica ($11,75 \pm 6,344$ para $28,50 \pm 10,41$). A carga parasitária dos macrófagos na presença destas células demonstra uma tendência de aumento, não sendo significativo (Fig 2A e B).

Os resultados demonstram, portanto, que a interação depende do tipo de célula que está sendo fagocitada, o que sugere a captação dos corpos apoptóticos ou necróticos por

diferentes receptores presentes na superfície dos macrófagos além da participação de diferentes mediadores liberados pelas duas linhagens celulares lisadas.

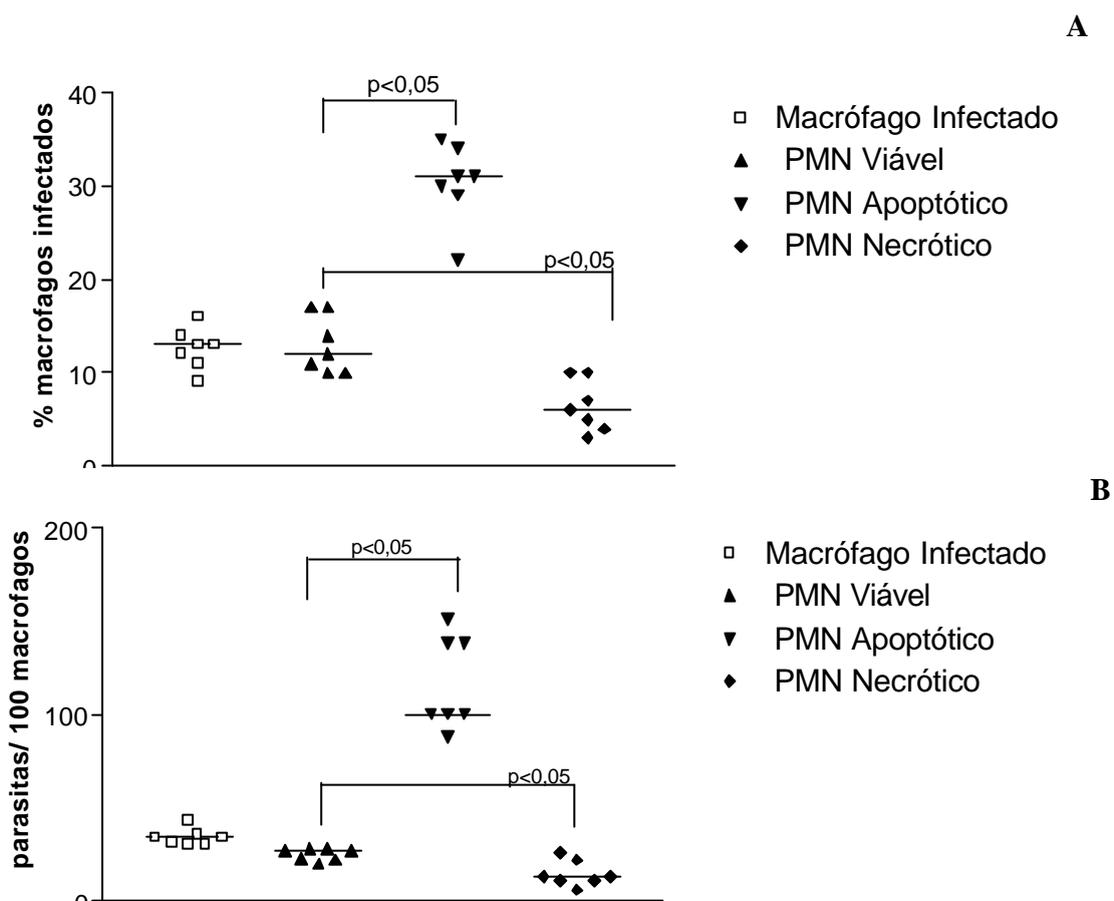


Figura 1: Efeito dos neutrófilos apoptóticos e necróticos na infecção de macrófago por *Leishmania amazonensis*. Macrófagos foram infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 2 parasitas para cada célula por 4 horas. Após este período, foi adicionado à cultura 3 neutrófilos para cada macrófago em diferentes condições: macrófago infectado (□) macrófago infectado + PMN viável (▲), macrófago infectado + PMN apoptótico (▼) e macrófago infectado + PMN necrótico (◆). A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro por três dias. Após este período as lamínulas foram fixadas em metanol por 20 minutos e coradas com HE. A taxa de infecção (A) e o número de parasitas/100macrófagos (B) foram determinados por microscopia óptica. n=7

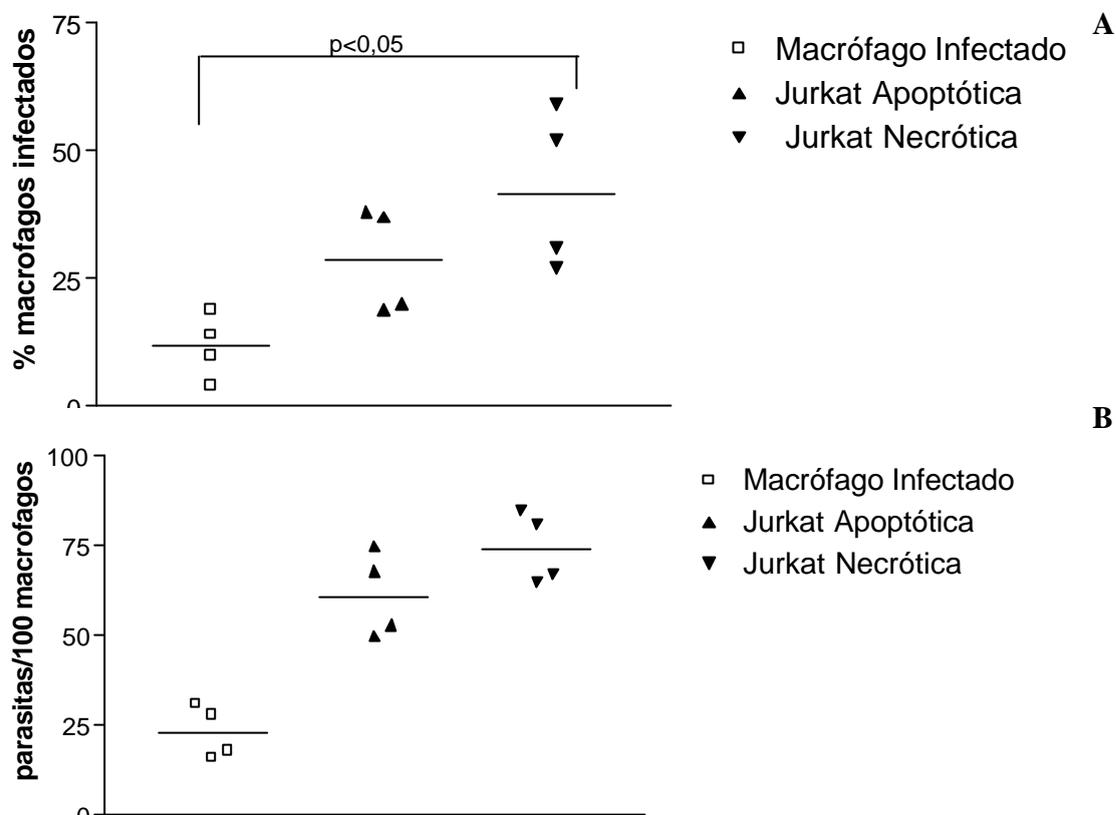


Figura 2: Efeito da célula Jurkat apoptótica e necrótica na infecção de macrófago por *L. amazonensis*. Efeito das células Jurkat na taxa de infecção de macrófago (A) e no número de parasitas/100macrófagos (B). Macrófagos foram infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 2 parasitas para cada célula por 4 horas. Após este período, foi adicionado à cultura 3 células Jurkat para cada macrófago em diferentes condições: macrófago infectado (□), macrófago infectado + Jurkat apoptótica (▲) e macrófago infectado + Jurkat necrótica (▼). A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro por três dias. Após este período as lamínulas foram fixadas em metanol por 20 minutos e coradas com HE. A taxa de infecção e o número de parasitas/100macrófagos foram determinados por microscopia óptica. n=4.

6.2 Papel do TGF- β e PGE₂ na interação entre macrófagos infectados e PMN apoptótico.

Dados na literatura têm demonstrado que a fagocitose de células apoptóticas leva à liberação de mediadores anti-inflamatórios, que inibem a atividade dos macrófago, como TGF- β e PGE₂ (FADOK e cols.,1998). Para verificar se o aumento na taxa de infecção observado na interação macrófago-PMN apoptótico foi dependente de TGF- β , co-cultivamos macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 2:1 e neutrófilos apoptóticos, na presença de anti-TGF- β humano. Como mostrado na figura 3, a adição do anticorpo neutralizante reverte o aumento observado na taxa de infecção ($51,29 \pm 30,82$ para $8,286 \pm 4,030$, $p < 0,05$) (Fig. 3A), assim como a replicação do parasita ($24,43 \pm 8,810$ para $7,571 \pm 4,721$, $p < 0,05$) (Fig. 3B) nos macrófagos que interagem com PMN apoptóticos de forma significativa.

Também foi avaliado o papel da PGE₂ neste processo. Neste caso, foi adicionado à cultura de macrófagos infectados e PMN apoptóticos, Indometacina, um inibidor da ciclo oxigenase (COX). Os resultados demonstram uma inibição no percentual da infecção dos macrófagos ($24,43 \pm 8,810$ para $5,00 \pm 1,00$, $p < 0,05$) (Fig. 4A), assim como na sua carga parasitária ($52,57 \pm 32,87$ para $6,143 \pm 1,952$, $p < 0,05$) (Fig. 4B).

Desta forma após a interação de PMN apoptóticos com receptores nos macrófagos e sua posterior fagocitose, ocorre a liberação de mediadores antiinflamatórios que inibem o macrófago favorecendo o desenvolvimento do parasita. TGF- β produzido pela interação entre macrófagos e células apoptóticas leva à atividade da ornitina descarboxilase (ODC) a qual produz a putrescina a partir da ornitina, permitindo assim o crescimento do *T cruzi* no interior do macrófago (FREIRE-DE-LIMA e cols., 2000). A inibição da produção de

PGE_2 pela adição de um inibidor da COX reverte o efeito das células apoptóticas sobre os macrófagos (FADOK e cols., 1998).

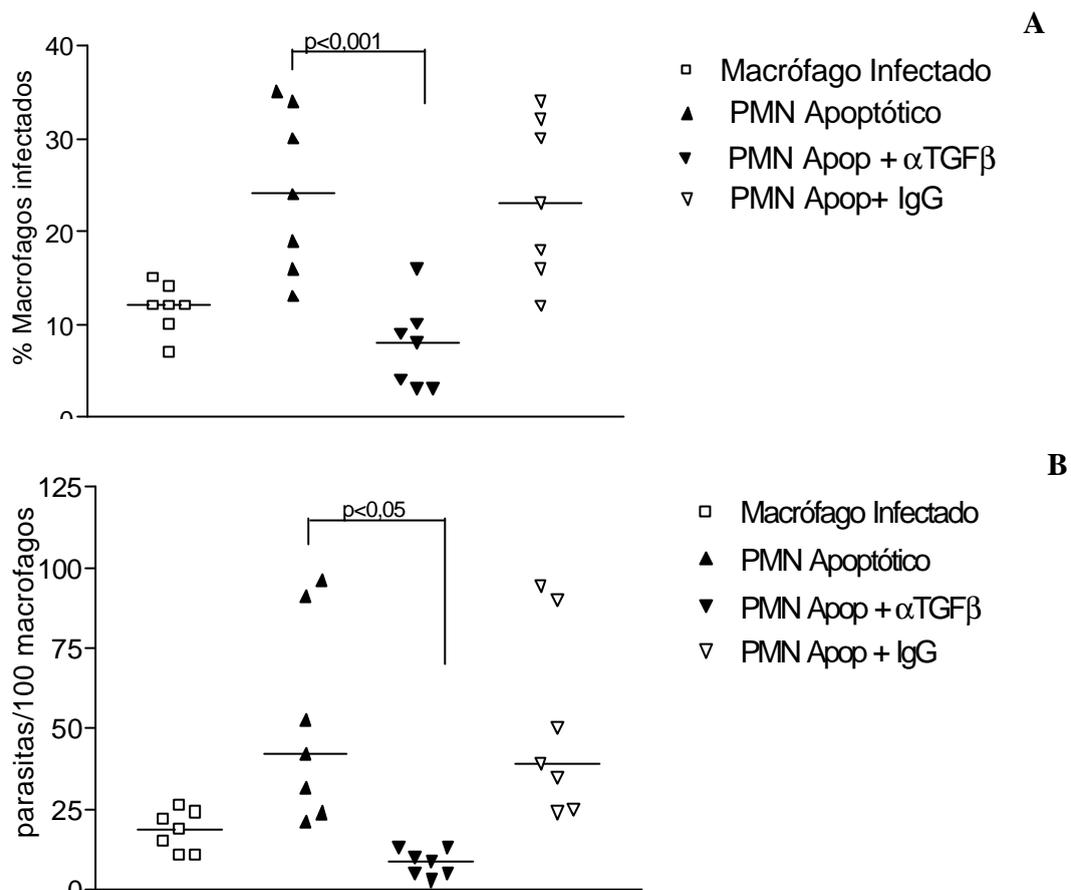


Figura 3: Efeito do TGF β na infecção de macrófago. Macrófagos foram infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 2 parasitas para cada célula por 4 horas. Após este período, foi adicionado à cultura 3 neutrófilos para cada macrófago em diferentes condições: macrófago infectado (□) macrófago infectado + PMN apoptótico (▲), com adição de 6 μ g/mL de anti-TGF β (▼) ou 6 μ g/mL de controle IgG de camundongo (▽) A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro por três dias. Após este período as lamínulas foram fixadas em metanol por 20 minutos e coradas com HE. A taxa de infecção (A) e o número de parasitas/100macrófagos (B) foram determinados por microscopia óptica. n=7

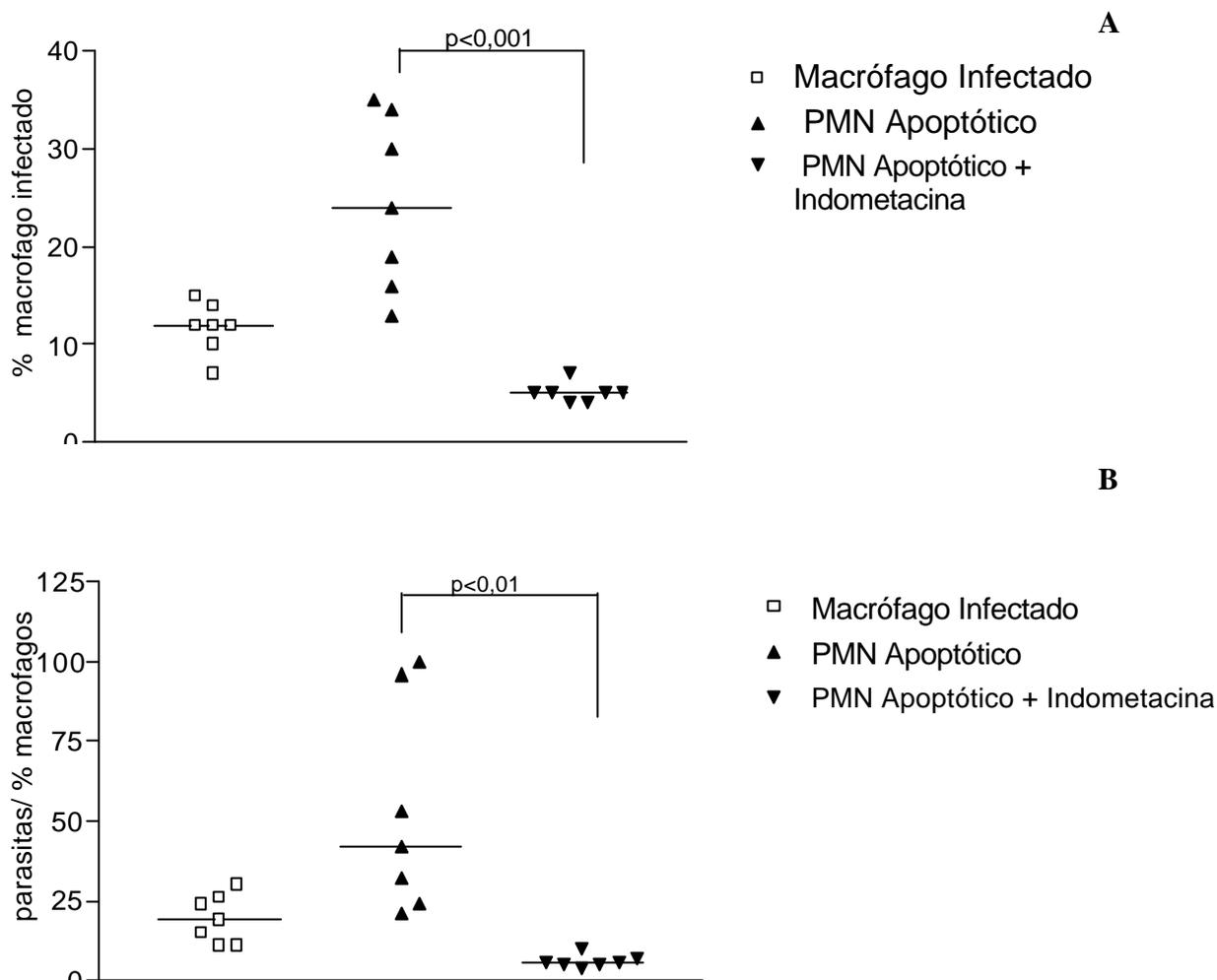


Figura 4: Efeito da PGE_2 na infecção de macrófagos. Macrófagos foram infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 2 parasitas para cada célula por 4 horas. Após este período, foi adicionado à cultura 3 neutrófilos para cada macrófago em diferentes condições: macrófago infectado (□) macrófago infectado + PMN apoptótico (▲), com adição de $1\mu\text{M}/\text{mL}$ de indometacina (▼). A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro por três dias. Após este período as lamínulas foram fixadas em metanol por 20 minutos e coradas com HE. A taxa de infecção (A) e o número de parasitas/100macrófagos (B) foram determinados por microscopia óptica. $n=7$

6.3 Papel do TNF- α e Elastase Neutrófila (NE) na interação entre macrófago infectado e PMN necrótico.

Dados existentes na literatura têm demonstrado que a fagocitose de alguns tipos de células necróticas ou lisadas, levam à liberação de mediadores pró – inflamatórios, como TNF- α , e ativam os macrófagos (SAVILL e cols., 2002; FADOK e cols., 2001). Para verificar se esta citocina está envolvida na diminuição da infecção dos macrófagos na presença de PMN necrótico, as culturas foram realizadas na presença do anticorpo anti TNF- α humano (6 μ g/mL). Nestas condições, foi observado um aumento na infecção dos macrófagos (6,800 \pm 0,8367 para 24,60 \pm 4,506, $p < 0,05$), mostrando a importância do TNF- α para o controle da mesma (Fig. 5). FADOK e cols. (2001), mostraram que a NE pode ser um indutor da produção de TNF- α pelos macrófagos humanos expostos a neutrófilos necróticos. Assim, foi adicionada à cultura de macrófagos e PMN necrótico, anti-elastase neutrófila humana. Como resultado, observou-se que a adição deste anticorpo nas culturas levou a um aumento na taxa de infecção dos macrófagos pela *Leishmania* (6,800 \pm 0,8367 para 18,00 \pm 1,732, $p < 0,05$) e também no número de amastigotas/100 macrófagos (8,833 \pm 1,722 para 27,00 \pm 7,043, $p < 0,05$) (Fig 6). Como um segundo controle do experimento, foi utilizada a antipaína que é um inibidor inespecífico de serina proteases. Neste caso, observamos um discreto aumento na taxa de infecção de macrófago que não foi significativo (6,800 \pm 0,8367 para 8,800 \pm 1,643). Desta forma, nossos resultados sugerem que a destruição dos parasitas após a fagocitose de neutrófilos necróticos está relacionado à liberação de NE.

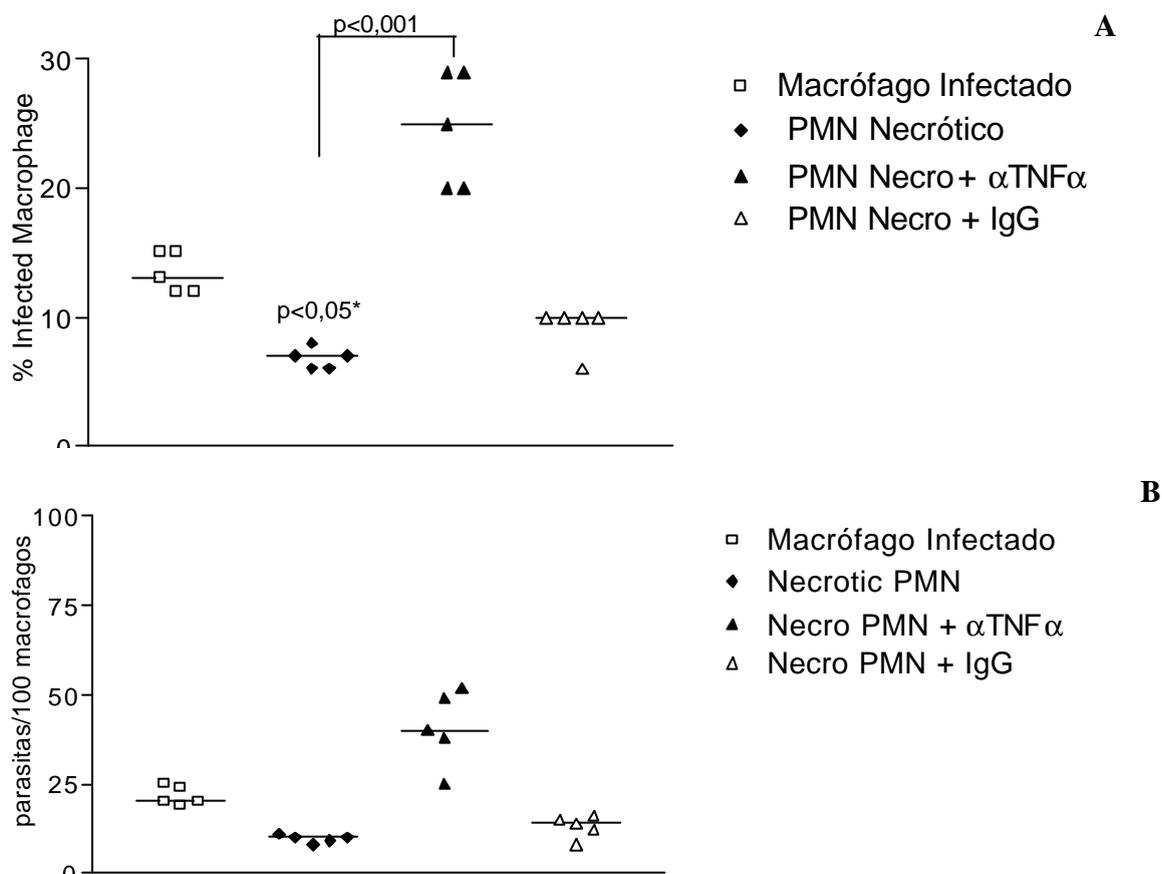


Figura 5: Efeito do TNF- α na infecção de macrófago. Macrófagos foram infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 2 parasitas para cada célula por 4 horas. Após este período, foi adicionado à cultura 3 neutrófilos para cada macrófago em diferentes condições: macrófago infectado (□) macrófago infectado + PMN necrótico (◆), com adição de 6 μ g/mL de anti TNF α (▲) ou 6 μ g/mL de IgG de camundongo (△). A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro por três dias. Após este período as lamínulas foram fixadas em metanol por 20 minutos e coradas com HE. A taxa de infecção (A) e o número de parasitas/100macrófagos (B) foram determinados por microscopia óptica. n=5

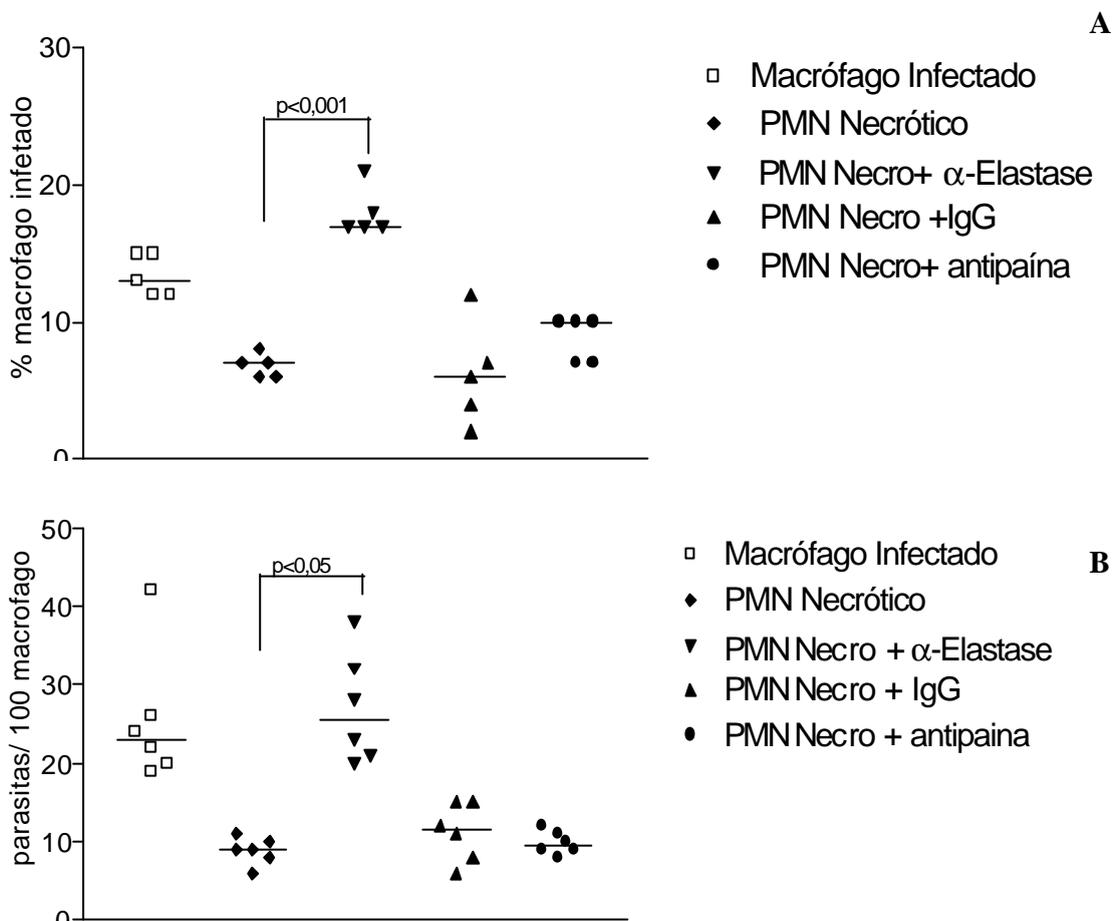


Figura 6: Efeito da elastase neutrofílica humana na infecção de macrófago. Macrófagos foram infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 2 parasitas para cada célula por 4 horas. Após este período, foi adicionado à cultura 3 neutrófilos para cada macrófago em diferentes condições: macrófago infectado (□) macrófago infectado + PMN necrótico (◆), com adição de 50 μ g/mL de anti elastase neutrofílica(▼) ou 50 μ g/mL de anti IgG de coelho(▲) ou 50 μ g/mL de antipaina (●). A cultura foi realizada sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro por três dias. Após este período as lamínulas foram fixadas em metanol por 20 minutos e coradas com HE. A taxa de infecção (A) e o número de parasitas/100macrófagos (B) foram determinados por microscopia óptica. n=5

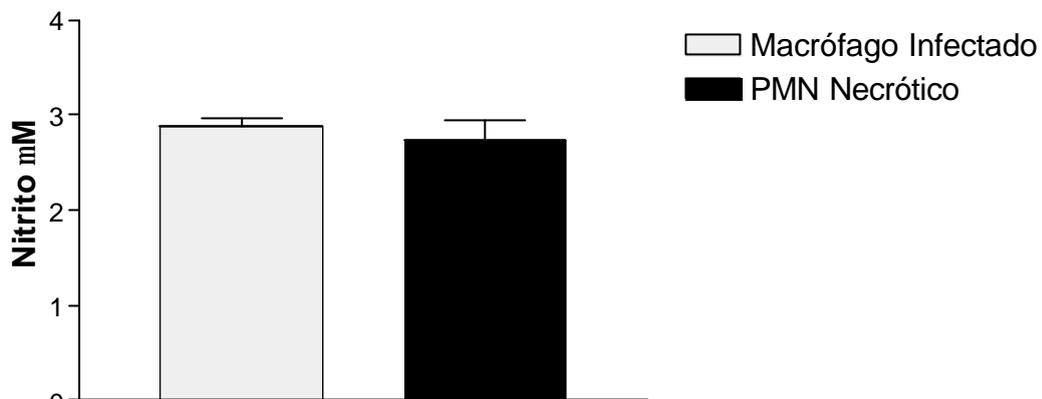
6.4 Mecanismo de morte do parasita na interação macrófago infectado:

PMN necrótico.

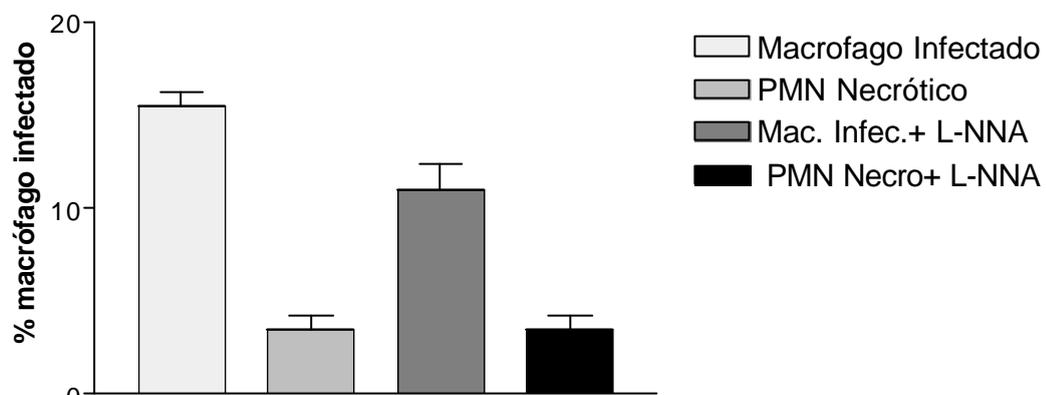
Alguns trabalhos têm demonstrado que tanto a NE quanto o TNF- α são capazes de induzir os macrófagos a secretar espécies reativas de oxigênio (SPEER e cols., 1984; LIEW e cols., 1990). Nas figuras 5 e 6 foi demonstrada uma redução na taxa de infecção dos macrófagos na presença de PMN necrótico. Para verificar se esta diminuição foi devida à produção de óxido nítrico (NO), realizamos o teste de Griess no sobrenadante destas culturas (Fig 7A). Não houve diferença na produção de óxido nítrico nas diferentes condições experimentais testadas ($2,881 \pm 0,08238$ para $2,735 \pm 0,2061$). Para confirmar este resultado, realizamos uma co-cultura entre macrófagos infectados e neutrófilos necróticos na presença de L- NNA, um inibidor da NOS. Os resultados demonstraram que não há diferença entre as taxas de infecção na presença ou ausência de L-NNA (Fig. 7B). Isto sugere que a morte do parasita ocorre por um mecanismo independente de NO.

Outro mecanismo responsável pela destruição dos parasitas seria pela produção de ROI. Assim adicionou-se às culturas catalase, um inibidor do peróxido de hidrogênio, simultaneamente com os PMN necróticos. Após 72 horas, as lamínulas foram lavadas e coradas com HE e a taxa de infecção determinada (Fig 7C). A adição da catalase induziu um aumento na infecção dos macrófagos ($34,00 \pm 2,828$ para $56,50 \pm 2,121$) sugerindo que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) está envolvido na morte dos parasitas observada na presença de neutrófilos necróticos.

A



B



C

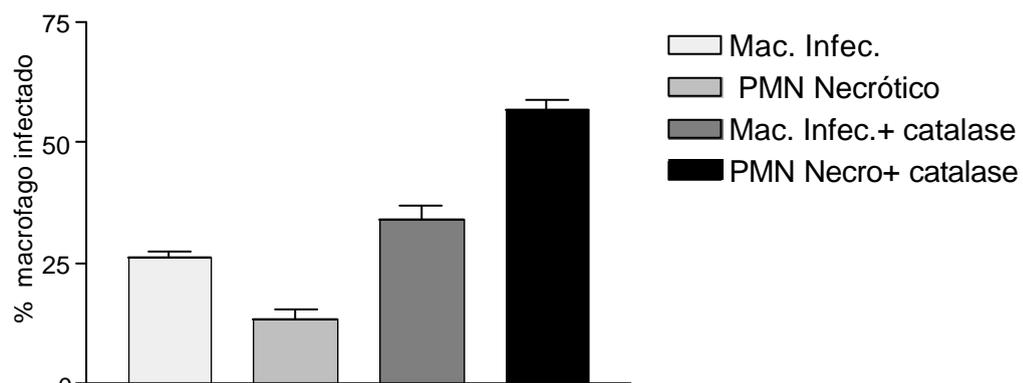


Figura 7: Mecanismo de morte dos parasitas em presença de PMN necrótico. Macrófagos foram infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 2 parasitas para cada célula por 4 horas. Após este período, foi adicionado à cultura 3 neutrófilos necróticos para cada macrófago A- Dosagem de óxido nítrico no sobrenadante das co-culturas pelo método de Griess B- Papel do NO na morte dos parasitas. Os macrófagos infectados foram cultivados apenas em meio ou em presença de PMN necrótico com ou sem adição de 1mM de L-NNA. C- Papel do ROI na morte dos parasitas. Os macrófagos infectados foram cultivados apenas em meio ou em presença de PMN necrótico com ou sem adição de 1000U/mL de catalase. Em B e C, as culturas foram realizadas sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro por três dias. Após este período as lamínulas foram fixadas em metanol por 20 minutos e coradas com HE. A taxa de infecção foi determinada por microscopia óptica. n=2

7. DISCUSSÃO

Dados da literatura têm demonstrado que o infiltrado neutrofílico ocorre 48-72 horas após a infecção de camundongos por *L. major* ou *L. amazonensis* (POMPEU e cols., 1991; GRIMALDI e cols., 1984). Alguns trabalhos também mostraram a presença de neutrófilos na infecção crônica por *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis* (POMPEU e cols., 1991; BEIL, 1992; MOURA e cols., 2005).

Os neutrófilos, entretanto, apresentam um curto ciclo de vida e são constitutivamente programados para morte celular por apoptose (SAVILL e cols., 1995). Neste caso, são removidos pelos macrófagos vizinhos ativados (SAVILL e cols., 1995). A remoção de células apoptóticas pode suprimir a inflamação, modulando a invasão e replicação intracelular de parasitas, assim como a resposta imune (SAVILL e cols., 2000). A liberação de mediadores antiinflamatórios suprime a produção de substâncias pró-inflamatórias (LOPES e cols., 2000).

Nossos resultados mostraram um aumento na infecção de macrófagos pela *Leishmania amazonensis* na presença de neutrófilos apoptóticos em um mecanismo dependente de TGF- β e PGE₂. A fagocitose de células apoptóticas no sítio inflamatório suprime a liberação de TNF- α (VOLL e cols., 1997; FADOK e cols., 1998) e induz a liberação de TGF- β ₁, PGE₂ e PAF por macrófagos humanos (FADOK e cols., 1998).

A fagocitose de linfócitos apoptóticos diminui a produção de óxido nítrico e aumenta o desenvolvimento de vacúolos de replicação e conseqüentemente a carga bacteriana nas culturas de macrófagos de camundongos infectados com *Coxiella burnetii* (ZAMBONI e cols., 2003). Além disso, a fagocitose de linfócitos apoptóticos por macrófagos de camundongos aumenta a infecção por *T. cruzi*. Esse aumento foi induzido pela liberação de

TGF- β e PGE₂ e pela geração de poliaminas (FREIRE-DE LIMA e cols., 2000). Os autores demonstraram que esses efeitos ocorreram através da interação da célula apoptótica com o receptor vitronectina expresso na superfície do macrófago (FREIRE-DE LIMA e cols., 2000). Foi também demonstrado que a fagocitose de linfócitos apoptóticos aumenta a replicação viral em macrófagos humanos infectados com HIV o que foi precedido da produção de TGF- β (LIMA e cols., 2002). Estes trabalhos indicam que a supressão induzida pela fagocitose de células apoptóticas favorece a infecção por diversos microorganismos intracelulares.

O tratamento local com anti-TGF- β em camundongos C57BL/6 leva a uma diminuição na carga parasitária e cura mais rápida em um mecanismo dependente da produção de NO, sem alteração no padrão da produção de IL-4 e IFN- γ (LI e cols., 1999). Já o tratamento com TGF- β promove o desenvolvimento de uma doença mais severa em camundongos infectados com *Leishmania brasiliensis* ou *Leishmania amazonensis*. O tratamento de camundongos suscetíveis BALB/c com anti-TGF- β promove um aumento da resistência destes com aumento da produção de IFN- γ e diminuição da produção de IL-4 (BARRAL-NETTO e cols., 1992).

A vacinação intramuscular de BALB/c com antígenos de *Leishmania amazonensis* (a-Lam), mas não o de *Leishmania brasiliensis* (a-Lb) aumenta a suscetibilidade para o desenvolvimento de Leishmaniose Cutânea, aumentando também a produção de TGF- β e IL-10 no linfonodo durante a resposta ao antígeno (PINHEIRO e cols., 2005). Também foi demonstrado que o antígeno de *L. amazonensis* induz apoptose de células T CD8⁺ (PINHEIRO e cols., 2005). Neste trabalho os autores sugeriram que podem existir componentes específicos da *L. amazonensis* que ativam a produção de TGF- β o que aumenta a

suscetibilidade individual agravando a doença após a vacinação com o antígeno (PINHEIRO e cols., 2005).

Célula mononucleares do sangue periférico humanas, estimuladas com IL-12 em presença de PGE₂ ou dexametasona apresentam capacidade de produção de IFN- γ diminuída. Isso acontece, pois a PGE₂ ou dexametasona diminuem a expressão da cadeia B1 do receptor IL-12 na superfície destas células, bem como a expressão do RNAm da cadeia B2 do receptor IL-12. A inibição observada ocorreu independentemente de IL-10, TGF- β e IL-4. As células continuaram não responsivas mesmo após um estímulo posterior com IL-12 exógena (WU e cols., 1998).

O TGF- β é requerido para a atividade da ODC (ornitina descarboxilase) (FREIRE-DE LIMA e cols., 2000) e uma vez que a ODC da célula do hospedeiro e a produção da ornitina são requeridas para a replicação intracelular de *L. major* (Iniesta e cols., 2001), é possível que as mesmas mudanças ocorram durante a fagocitose de neutrófilos apoptóticos humanos por macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

Por outro lado, a infecção por *L. major* em BALB/c e em C57BL/6 mostram diferentes resultados na presença de neutrófilos apoptóticos. A injeção de neutrófilos apoptóticos aumenta a replicação de *L. major* em BALB/c *in vivo* e previne o crescimento do parasita em C57BL/6. Esse crescimento foi dependente da liberação de TGF- β e PGE₂ pelos macrófagos e a morte observada em C57BL/6 foi dependente da liberação de TNF- α e elastase neutrofílica (NE) (RIBEIRO-GOMES e cols., 2004). Os autores sugeriram a existência de dois tipos de PMN de acordo com o genótipo do hospedeiro: tipo 1 para o PMN derivado de BALB/c que induz um aumento na infecção de macrófagos pela liberação de

TGF- β e PGE₂ e tipo 2 para PMN derivado de C57BL/6 que induz queda na infecção dos macrófagos pela liberação de TNF- α e NE.

Células dendríticas de camundongos BALB/c que fagocitaram célula apoptóticas tiveram a produção de IL-12 diminuída quando estimuladas com LPS. Isso levou a uma diminuição da expressão de CD86, e as células dendríticas apresentaram uma capacidade reduzida na estimulação das células T. Todas estas mudanças, no entanto, foram independentes da liberação das citocinas TGF- β e IL-10 (STUART e cols., 2002). Entretanto a interação entre células dendríticas e células apoptóticas ainda é controversa.

ROVERE e cols. (1998) demonstraram que a interação entre corpos apoptóticos e células dendríticas induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 e TNF- α e aumenta a expressão de moléculas co-estimulatórias. Essa diferença de resposta existente entre células dendríticas e macrófagos pode refletir o uso de diferentes receptores de reconhecimento padrão (PRR), o que leva a caminhos distintos de sinalização, levando a uma produção diferenciada de citocinas pelas duas linhagens celulares (ROVERE e cols., 1998; VOLL e cols., 1997; FADOK e cols., 2000).

Os macrófagos podem se tornar ativados e liberar mediadores pró-inflamatórios quando fagocitam células em necrose secundária (SAVILL e cols., 2000). A necrose secundária é uma eventual desintegração das células que entraram em apoptose e não foram retiradas por fagócitos (SAVILL e cols., 2002). Nossos resultados demonstraram que a fagocitose de neutrófilos necróticos induzem uma redução na infecção causada pela *L amazonensis* de macrófagos humanos, em um mecanismo dependente de TNF- α e elastase neutrofílica.

O lisado de neutrófilos tem a habilidade de estimular a produção de MIP-2, IL-8, TNF- α e IL-10 por macrófagos humanos (FADOK e cols., 2001). A adição de anti-elastase reduz os efeitos pró-inflamatórios e o lisado de neutrófilos passa a induzir o mesmo comportamento observado nos macrófagos em presença de células apoptóticas (FADOK e cols., 2001). Esses autores sugerem que as serino proteases, como a elastase, podem ser pró-inflamatórias por estimularem os macrófagos induzindo a produção de citocinas. (FADOK e cols., 2001). TNF- α está associado à resistência contra muitos patógenos. *In vitro*, TNF- α está envolvido na indução de óxido nítrico que contribui para atividade microbicida de macrófagos contra *L major* (LIEW e cols., 1990) e *T cruzi* (SILVA e cols., 1995). Muitos trabalhos mostraram a importância de TNF- α no controle de infecções induzidas pela *L major* (TITUS e cols., 1989; WILHELM e cols., 2001).

Elastase neutrofílica está envolvida na injúria tecidual e na inflamação mediada por neutrófilos (LEE e cols., 2001). Foi demonstrado que a elastase induz a produção de IL-8 via ligação com TLR4 em células epiteliais (DEVANEY e cols., 2003), ativando e atraindo mais neutrófilos para o sítio inflamatório (WALSH e cols., 2001). É também a maior contribuidora para a indução de mediadores pró-inflamatórios e IL-10 pelos macrófagos (FADOK e cols., 2001). Foi demonstrado que a elastase neutrofílica liga-se especificamente aos macrófagos e aumenta a produção de quimiocinas (ISLIHARA e cols., 1999). A elastase pancreática induz a produção de TNF- α pelos macrófagos em um mecanismo dependente de NF κ B (JAFFRAY e cols., 2000).

Em fibroblastos humanos infectados com *Toxoplasma gondii*, foi caracterizado um inibidor de serino protease TgPI-1. Este inibidor possui domínios inibitórios para tripsina, elastase e quimiotripsina. É secretado dentro do vacúolo parasitóforo durante a fase de

replicação deste parasita (MORRIS e cols., 2002). Os autores sugerem que esta secreção é um mecanismo utilizado pelo parasita para escapar do sistema imune.

Nossos resultados mostraram que neutrófilos necróticos presentes nas culturas induzem uma diminuição da infecção causada pela *L. amazonensis* em macrófagos humanos. Esse efeito foi abolido quando foi adicionado às culturas anti-elastase neutrofílica e anti-TNF- α , mostrando o papel da elastase e do TNF- α na resolução da infecção.

RIBEIRO-GOMES e cols. (2004), demonstraram que a neutralização da NE ou TNF- α induz os neutrófilos de C57BL/6 a se comportarem como os neutrófilos de BALB/c, levando à exacerbação da replicação da *Leishmania major* nos macrófagos de C57BL/6 em presença de neutrófilos apoptóticos. Os autores sugerem que a via pró-inflamatória em C57BL/6 consegue superar a via de desativação dos macrófagos induzida pela remoção das células apoptóticas.

Alguns trabalhos têm demonstrado que a elastase neutrofílica (SPEER e cols., 1984) e TNF- α (LIEW e cols., 1990) induzem a produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Camundongos deficientes em proteases neutrofílicas, mas normais quanto a ROI, são incapazes de resistir a infecções causadas por *Staphilococcus* e *Cândida*. As proteases ativadas destroem os microorganismos (REEVES e cols., 2002).

Alguns trabalhos têm demonstrado a importância do óxido nítrico no controle da infecção causada pela *Leishmania*. Camundongos sem iNOS infectados com *Leishmania donovani* não são capazes de controlar a infecção (MURRAY e cols., 1999). Foi detectada a presença de NO em sobrenadante de culturas de macrófagos murinos infectados com *Leishmania chagasi*, mas não em culturas de macrófagos humanos. (GANTT e cols., 2001). Entretanto, observou-se a expressão do RNAm e da proteína iNOS na medula óssea de

pacientes com leishmaniose visceral. Além disso, foi detectado um aumento da proteína iNOS em macrófagos humanos infectados com *Leishmania chagasi* in vitro na presença de IFN- γ (GANTT e cols., 2001). Por outro lado, alguns trabalhos demonstraram a participação de NO na resposta contra patógenos intracelulares em macrófagos humanos infectados com *Leishmania major* (VOLDOWKIS e cols., 1995) e *Mycobacterium tuberculosis* (NICHOLSON e cols., 1996). Alguns trabalhos demonstraram que os níveis séricos de NO são elevados (EREL e cols., 1999 e SERARSLAN e cols., 2005), e também a atividade de SOD, em pacientes com leishmaniose cutânea (EREL e cols., 1999).

Neste trabalho verificamos o mecanismo e morte dos parasitas nas co-culturas de macrófagos infectados e PMN necróticos. Avaliamos a produção de NO pelo teste de Griess, porém, não observamos diferenças na produção de NO pelos macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis* na presença ou ausência de neutrófilos necróticos, sugerindo que a morte dos parasitas foi mediada por outros mecanismos independentes da produção de NO. Para testar esta hipótese adicionamos catalase na co-cultura de neutrófilos necróticos e macrófagos infectados. Nossos resultados mostraram que a infecção dos macrófagos aumenta em presença da catalase, sugerindo que espécies reativas de oxigênio participam do controle da infecção dos macrófagos pela *Leishmania amazonensis*, mas não o óxido nítrico. Nós sugerimos que em presença da catalase a via inibitória da fagocitose começa a atuar, anulando a ação da via inflamatória, induzindo os neutrófilos necróticos a um comportamento semelhante ao observado com os neutrófilos apoptóticos.

Macrófagos murinos e humanos produzem O_2^- durante a fagocitose de promastigotas de *Leishmania* opsonizadas, sendo estes radicais mais efetivos no controle dos parasitas em seres humanos. (GANTT e cols., 2001). Intermediários reativos de oxigênio são

necessários para induzir a ativação de NF κ B em macrófagos que interagem com *Leishmania donovani* (SINGH e cols., 2004). O NF κ B em macrófagos, tem um importante papel na regulação da resposta inflamatória e na defesa do hospedeiro (GHOSH e cols., 1998; BAEUERLE e cols., 1997)

RIBEIRO-GOMES e cols. (2004), mostraram que a diminuição na carga parasitária de macrófagos de C57BL/6 infectados com *L. major* foi independente de NO. Entretanto, a adição de catalase levou a um aumento da infecção, sugerindo que o controle do parasita também foi dependente de espécies de oxigênio.

8. CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste trabalho indicam que a infecção dos macrófagos humanos pela *Leishmania amazonensis* é modulada em presença de neutrófilos apoptóticos e necróticos.

A modulação observada depende da liberação de mediadores que são anti-inflamatórios (TGF β e PGE $_2$) em presença de neutrófilos apoptóticos ou de mediadores que são pró-inflamatórios (NE, TNF- α e ROI) em presença de neutrófilos necróticos.

Entretanto, mais estudos são necessários para o entendimento desta fase inicial da resposta contra a infecção causada pela *Leishmania* o que permitirá o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra esta doença.

9. PERSPECTIVAS

Trabalhos na literatura mostram que PMN inflamatórios apoptóticos retirados de camundongos que apresentam diferentes suscetibilidades à infecção por *L. major* induzem comportamentos diferentes na infecção dos macrófagos (RIBEIRO-GOMES e cols., 2004). Além disso, POMPEU, e cols. (2001) mostraram a existência de indivíduos que produzem rapidamente IFN- γ após infecção com *L. amazonensis*, enquanto outro grupo de indivíduos produzem IFN- γ mais tardiamente. Assim, pretendemos verificar se PMN humanos apoptóticos e necróticos inflamatórios também induzem comportamentos diferentes na infecção de macrófagos autólogos por *Leishmania* e também na posterior ativação de linfócitos humanos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALLEN, L.A.H. Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes. **Microbes infect.**, **5**:1329-1335, 2003.

AKGUL, C.; MOUDING, D.A.; EDWARDS S.W. Molecular control of neutrophil apoptosis. **FEBS Lett.**, **487**: 318-322, 2001.

BACELLAR O., LESSA H., SCHRIEFER A., MACHADO P., RIBEIRO DE JESUS A, DUTRA W.O, GOLLOBO K.J., CARVALHO E.M. Upregulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection & Immunity** **70**: 6734-6740, 2002

BAEUERLE, P.A.; Baichwal VR. 1997. NF- κ B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. **Adv. Immunol.**, **65**: 111-137.

BARRAL A, PEDRAL-SAMPAIO D., GRIMALDE JUNIOR G., MOMEN H., MCMAHON-PRATT D., RIBEIRO DE JESUS A, ALMEIDA R., BADARO R., BARRAL-NETTO, M., BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.;

ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, **257**: 545, 1992.

BEIL, W.J.; MEINARDUS-HAGER, G.; NEUGEBAUER, D.; SORG, C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous Leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **J. Leukoc. Biol.**, **52**: 135-142, 1992.

BITTENCOUR A.L., DE FREITAS L.A, POMPEU M.L., VIEIRA M.L., BARRAL A. Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **85** 53-59, 1990

BOMFIM G, NASCIMENTO C., COSTA J., CARVALHO E.M., BARRAL-NETTO M., BARRAL A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology** **84**:188-194, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2000. 78p.

BRASIL. Fundação Nacional da Saúde (FNS). **Boletim Epidemiológico**. v.2, n.5, 2002

BRINKMANN, V.; REICHAHD, U.; GOOSDMANN, C.; FAULER, B.; UHEMANN, Y.; WEISS, D.S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSK, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **SCIENCE.**, **303**: 1532-1535, 2004.

CARVALHO E.M., BARRAL A, COSTA J.M., BITTENCOUR A, MARSDEN P. clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica 56:** 315-325,1994.

CARVALHO E.M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg 44:** 536-46, 1991

CARVALHO L.P.; PASSOS S.T.; JESUS A.R. Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar. **Gazeta Médica da Bahia 75(1):** 57-65, 2005.

COSTA J.M., SALDANHA A C., DE MELO E SILVA A C., SERRA NETO A, GALVAO C.E., PEDROSO E SILVA M., DA SILVA A R. [The current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhão. II. The epidemiological and clinico-evolutionary aspects]. **Rev Soc Bras Méd Trop 25:** 115-23,1992.

DEVANEY, J.M.; GREENE, C.M.; TAGGART, C.C.; CARROL, T.P.; O'NEIL, S.J.; MCELVANEY, N.G. Neutrophil elastase up-regulates interlekin-8 via toll like receptor 4. **FEBS Lett, 544 :**129-132, 2003.

EDWARDS, S.W. Biochemistry and Physiology of the neutrophil. New York: **Cambridge University Press**, 1994.

ELLIS, T.N.; BEAMAN, B.L. Interferon- γ activation of polymorphonuclear neutrophil function. **Immunol.**, **112**: 2-12, 2004.

EREL, O.; KOC.; YIGCIT, A.; BULUT, V. Reactive nitrogen and oxygen intermediates in patients with cutaneous leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, **94**: 179-83, 1999.

FADOK, V.A.; BRANTON, D.L.; FREED, P.W.; WESTCOTT, J.Y.; HENSON, P.M.; Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanism involving TGF- β , PGE₂ and PAF. **J. Clin. Invest.**, **4**: 890-898

FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; ROSE, D.M.; PEARSON, A.; EZEKEWITZ, R.A.; HENSON, P.M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Nature.**, **405**: 85-90, 2000.

FADOK, V.A.; BRANTON, D.L.; GUTHRIE, L.; HENSON, P.M. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: Role of proteases. **J. Immunol.**, **166**: 6847-6854, 2001.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.**, **5**: 1317-1327, 2003.

FONSECA, S.G.; ROMÃO, P.R.T.; FIGUEIREDO, F.; MORAIS, R.H.; LIMA, H.C.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F. TNF- α mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, **33**: 2297-2306, 2003.

FRANC, N.C; WHITE, K; EZEKOWITZ, R.A. Phagocytosis and development: back to the future. **Curr Opin Immunol**, **11**: 47-52, 1999.

FREIRE-DE-LIMA, C.; NASCIMENTO, D.O; SOARES, M.B.P.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.; MELLO, F.G.; REIS, M.G, LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature.**, **403**: 199-203, 2000.

GANTT, K.R.; GOLDMAN, T.L.; McCORMICK, M.L.; MILLER, M.A.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.T.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Oxidative response of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.**, **167**: 893-901, 2001.

GHOSH, S.; M.A.Y.; M.J.; KOPP, E.B. NF-kappa B and Rel protein: evolutionary conserved mediators of immune response. **Annu. Rev. Immunol.**, **16**: 225-260, 1998.

GRIMALDI, C. Jr.; SOARES, R.J, MORIEARTY, P.L. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, **6**: 397-408, 1984.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature.**, **407**:770-6, 2000.

INIESTA, V.; GÓMEZ-NIETO, L.C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N^W-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside amcrophages. **J. Exp. Med.**, **193**:777, 2001.

ISHIHASRA, K.; YAMAGUCHI, Y.; OKABE, K.; OGAWA, M. Neutrophil elasetase enhanced macrophage production of chemokines in receptor-mediated reaction. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, **103**:139, 1999.

JAFFRAY, C.; MENDEZ, C.; DENHAN, W.; CARTER, G.; NORMAN, J. Specific pancreatic enzymes activate macrophages to produce tumor necrosis factor-a: role of nuclear factor kB proteins. **J. Gastr. Sur.**, **4**: 370, 2000.

JEWETT, A.; HUME, W.R.; Le, H.; HUYNH, T.N.; HAN, Y.W.; CHENG, G.; SHI, W. Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. **Infect Immun.**, **68**:1893-8, 2000.

KOBAYASHI, S.D.; VOYICH, J.M.; DeLeo, F.R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes Infect.**, **5**: 1337-1344, 2003.

KRAMMER, P.H. CD95's deadly mission in the immune system **Nature.**, **407**: 789-95, 2000.

LAUNSON, R.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **82**: 421-4, 1987.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends Microbiol.**, **11**: 210-214, 2003.

LEE, W.L.; DOWNEY, G.P. Leukocyte elastase: physiological function and role in acute lung injury. **Am. Respir. Crit. Care Med.**, **164**: 896, 2001.

LEE W.L.; HARRISON, R.E.; GRISTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes Infect.**, **5**: 1299-1306, 2003.

LENARDO, M.; CHAN, K.M.; HORNUNG, F.; McFARLAND, H.; SIEGEL, R.; WANG, J.; ZHENG, L. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. **Ann. Rev. Immunol.**, **17**: 221-53, 1999.

LI, J.; HUNTER, C.A.; FARREL, J.P. Anti-TGF- β treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by-enhanced in vivo nitric oxide production. **J. Immunol.**, **162**: 974-979, 1999.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; MILLOT, S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, 145:4305-4310, 1990.

LIMA, G.M.A.C.; VALLOCHI, A.L.; SILVA, U.R.; BEVILACQUA, E.M.A.F.; KIFFER, M.M.F.; ABRAHAMSON, I.A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. **Immunol. Letters.**, 64:145-151, 1998.

LIMA, R.G.; WEYENBERGH, J.V.; SARAIVA, E.M.B.; BARRAL-NETTO, M.; GALVÃO-CASTRO, B.; BOU-HABIB, D.C. The replication of HIV type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. **J. Infect. Dis.**, 185: 1561-1566, 2002.

LOPES, M.F.; VEIGA, V.F.; SANTOS, A. R.; FONSECA, M.E.; DOS REIS, G.A. Activation-induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. **J. Immunol.**, 154: 744-752, 1995.

LOPES, M.F.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; DOS REIS, G.A. The macrophage haunted by cell ghosts: a pathogen grows. **Immunol. Today.**, 21: 489-494, 2000.

MACHADO P., ARAUJO C., DA SILVA A T., ALMEIDA R. P., D'OLIVEIRA JUNIOR A, BITTENCOUR A, CARVALHO E.M. failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clinical Infectious Disease** 34: 69-73, 2002.

DE MOURA, T.; NOVAIS, F.O; OLIVEIRA, F.; CLARENCIO, J.; NORONHA, .A; BARRAL, A., BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C.I. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, **73**: 5827-34, 2005.

MORRIS, M.T.; COPPIN, A.; TOMAYO, S.; CARUTHERS, V.B. Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. **J. Biol. Chem.**, **277**: 45259-66, 2002.

MULLER K.; van ZANDBERGEN G.; HANSEN B.; LAUFUS H.; JAHNKE N.; SOLBACH W.; LASKAY T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med Microbiol Immunol**, **190(1-2)**:73-6, 2001.

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

NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA, M.D.; LAPA E SILVA JR., NATHAN, C.; XIE, Q.W.; MUNFORD, R.; WEIDNER, J.R.; CALAAYCAY, J.; GENG, J.; BOECHAT, N. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J. Exp. Med.**, **183**:2293, 1996.

PEARSON, R.D. & SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, **22**: 1-13, 1996.

PINHEIRO, R.O.; PINTO, E.F.; LOPES, J.R.C.; GUEDES, H.L.M.; FENTANES, R.F.; ROSSI-BERGMANN, B. TGF- β - associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. **Microbes and Infection**, **7(13)**:1317-1323, 2005.

POMPEU, M.L.; FREITAS, L.A; SANTOS, M.L.V.; KHOURI, M.; BARRAL-NETTO M. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta Trop.**, **48**:185-193, 1991.

POMPEU, M.L.; BRODSKY C.; TEIXEIRA M.J.; CLARÊNCIO J.; van WEYENBERG J.; COELHO I.C.B.; CARDOSO S.A.; BARRAL A.; BARRAL-NETTO M. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. **Infection and Immunity**, **69 (12)**: 7493-7460, 2001.

RAO, R.M.; BETZ, T.V.; LAMONT, D.J.; KIM, M.B.; SHAW, S.K.; FROIO, R.M.; BALEUX, F.; ARENZANZ-SEISDEDOS, F.; ALON, R.; LUSVCINSKAS, F.W.; Elastase release by transmigrating neutrophils deactivates endothelial-bound SDF-1 α and attenuates subsequent T lymphocyte transendothelial migration. **J. Exp. Med.**, **200**:713-724, 2004.

RIBEIRO-DE-JESUS A, ALMEIDA R.P., LESSA H., BACELLAR O., CARVALHO E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical Biological Research** **31**: 143-148, 1998.

RIBEIRO-GOMES, F.; OTERO, A C.; GOMES, N.A; MONIZ-DE-SOUZA, M.C.A; FINKELSTEIN, L.C.; ARNHOLDT, A C.; CALICH, V.L.; COUTINHO, S.G.; LOPES, M.F.; DOS RREI, G.A; Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J. Immunol.** **172**: 4454-4462, 2004.

REEVES, E.P.; LU, H.; JACOBS, H.L.; MESSINA, C.G.; BOLSOVER, S.; GABELLA, G.; POTMA, E.A; WARLEY, A; ROES, J.; SEGAL, A W. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. **Nature.**, **416**: 291-297, 2002.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S, Ferrua B, Michiels JF, Anjuère F, Fragaki K, Fichoux YL, Kubar J. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiol.**, **1**:17., 2001.

ROVERE, P. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. **J. Immunol.**, **161**: 4467-4471, 1998.

SAVILL, J.; HASLETT, C. Granulocytes clearance by apoptosis in the resolution of apoptosis. **Semin. Cell. Biol.**, **6**:385-393, 1995.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, **407**: 784-788, 2000.

SAVILL, J.; DRANSKIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nature Rev.**, **2**: 965-975, 2002.

SCOTT P., NATOVITZ P. COFFMAN R.L., PEARCE E., SHER A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **Journal of Experimental Medicine** **168**: 1675-1684,1988

SCOTT P., PEARCE E., CHEEVER A W., COFFMAN R.L., SHER A. Role of cytokine and Cd4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunology Review** **112**: 161-182,1989

SCOTT P., SACKS D.L., SHER A. Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. **Journal of Immunology** **131**: 966-971,1983

SHER A, SACKS D.L., SCOTT P.A. Host and parasite factors influencing the expression of cutaneous leishmaniasis. **Ciba Fondation Symposium** **99**: 174-189,1983

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.R.; CARDOSO, M.A G.; ALIBERTI, J.C.S.; CUNHA, F.Q.;
Tumor necrosis factor alpha mediates resistanse to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by
inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infec
Immun.**, **63**: 4862-4867.

SERASLAN, G.; YYLMAZ, H.R.; SOGUT, S. Serum antioxidant activities,
malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp.
Dermatol.**, **30**:267-271, 2005.

SINGH, V.K.; BALARAMAN, S.; TEWARY, P.; MABHUBALA, R. *Leishmania donovani*
activates nuclear transcription factor – κ B in macrophages through resctive oxygen
intermediates. **Biochem. Biophs. Res. Commun.**, **322**:1086-1095, 2004.

SPEER, C.P.; PABST, M.J.; HEDEGAARD, H.B.; REST, R.F.; JOHNSTON, Jr. R.B.;
Enhanced release of oxigen metabolites by monocyte-derived macrophage exposed to
proteolytic enzymes: activity of neutrophil elastase and cathepsin G. **J. Immunol.**, **133**: 2151,
1984.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Annu Rev Biochem.**,
69:217-45, 2000.

STUART, L.M.; LUCAS, M.; SIMPSON, C.; LAMB, J.; SAVILL, J.; LACY-HULBERT, A. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. **J. Immunol.**, **168**:1627-1635, 2002.

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

TEIXEIRA, M.J.; TEIXEIRA, C.R.; ANDRADE, B.B.; BARRAL-NETTO, M; BARRAL, A. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **TRENDS in parasitology**, **22**:30-40. 2006

TITUS, R.G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, **170**: 2097, 1989.

VENUPRASAD, K.; BANERJEE, P.; CHATTOPADHYAY, S.; SHARMA, S.; PAL, S.; PARAB, P.B.; MITRA, D.; SAHA, B. Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce secretion and restriction of *Leishmania* growth. **J. Immunol.**, **169**:920-928, 2001.

VENUPRASAD, K.; CHATTOPADHYAY, S.; SAHA, B. CD28 signaling in neutrophil induces T-cell chemotactic factor(s) modulating T-cell response. **Hum. Immunol.**, **64**:38-43

VOLL, R.E.; HERMANN, M.; ROTH, E.A.; STACH, C.; KALDEN, J.R.; GIRKONTAITE, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. **Nature**, **405**:350-351, 1997.

VOLDOUSKIS, L.; RIVEROS-MORENO, V.; DUGAS, B.; OUAZZ, F.; BECHEREL, P.; DEBRE, P.; MONCADA, S.; MOSSALAYI, M.D. The killing of *Leishmania* major by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcεRII/CD23 surface antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**:7804.

WALSH, D.E.; GREENE, C.M.; CARROLL, T.P.; TAGGART, C.C.; GALLAGHER, P.M.; O'NEIL, S.J.; McELVANEY, N.G. Interleukin-8 up-regulation by neutrophil elastase is mediated by MyD88/IRAK/TRAF-6 in human bronchial epithelium. **J. Biol. Chem.**, **276**:35494-35499.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. disponível em <http://www.who.int/tdr/disease/leish/deaful.htm>

WILHELM, P.; RITTER, U.; LABBOW, S.; DONHAUSER, N.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C.; KORNER, H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. **J. Immunol.**, **166**: 4012, 2001.

WITTAMER, V.; BONDUE, B.; GUILLABERT, A.; VASSAT, G.; PARMENTIER, M.; COMMUNI, D. Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptative immunity. **J. Immunol.**, **175**:487-493, 2005.

WU, CY.; WANG, K.; McDYER, J.F.; SEDER, R.A. Prostaglandin E2 and Dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. **J. Immunol.**, **161**:2723-2730, 1998.

ZAMBONI, D.S.; RABINOVICH, M. Phagocytosis of apoptotic cells increase the susceptibility of macrophages to infection with *Coxiella burnetii* phase II through down-modulation of nitric oxide production. **Infect Immun.**, **72**:2075-2080.

VAN ZANDBERGEN, G.; HERMANN, N.; LAUFS, H.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin 8 but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocyte. **Infect.Immun.**, **70**: 4177-4184, 2002.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J. Immunol.**, **173**: 6521-6525, 2004.

ZYCHINSKY, A.; WEINRAUCH, Y.; WEISS, J. Forum in immunology on neutrophils. **Microbes Infect.**, **5**:1289-1291, 2003.

Anexo I – Manuscrito do artigo para ser publicado

Human macrophage infection by *Leishmania amazonensis* is modulated through of clearance of apoptotic or necrotic human neutrophils

Lilian Afonso^{1,2}; Valéria Borges²; Flávia Ribeiro Gomes³; George dos Reis³; Aldina Barra^{2,4}; Manoel Barra-Neto^{2,4}; Cláudia Brodskyn^{2,1,5}

Abstract

Neutrophils are programmed to undergo apoptosis and provide the first line of defense against infections. Macrophages uptake apoptotic cells releasing anti-inflammatory mediators. In the present study, we evaluated the effect of human apoptotic and necrotic neutrophils on phagocytosis human *Leishmania amazonensis* infected macrophages. The results showed an increase on the frequency of macrophage infection by *Leishmania* as well as its parasite burden in the presence of apoptotic neutrophils, but not in the presence of viable neutrophil. We observed that this increase is dependent on TGF-beta and PGE₂ released by macrophages, since the presence of anti TGF-beta and/or Indometacine abolished the effect observed. On the other hand, when necrotic neutrophils were used, there was a reduction on the frequency of macrophage infection as well as its parasite burden. This reduction was dependent on TNF-alpha and Neutrophilic Elastase (NE) release, since the presence of anti TNF-alpha and/or anti-elastase abolished the effect observed. The control with Jurkat cell showed an increase on the frequency of macrophage infection by *Leishmania* as well as their parasite burden in the presence of apoptotic and necrotic cells. We did not observe differences in NO production by human macrophages infected by *L. amazonensis* in presence or absence of necrotic neutrophils, suggesting that the killing of parasite is mediated by other mechanism independent of NO production, but dependent on ROI, since catalase inhibited the effect observed. Understanding this initial response against *Leishmania amazonensis* parasite is important to interfere in therapeutic and vaccine strategy.

-
- 1- Programa de Pós Graduação em Imunologia - Universidade Federal da Bahia
 - 2- Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA
 - 3- Instituto de Biofísica Carlos Chagas – Universidade Federal do Rio de Janeiro
 - 4- Faculdade de Medicina – Universidade Federal da Bahia
 - 5- Institute of Investigation in Immunology – III

Introduction

Polymorphonuclear leukocyte (Neutrophil, PMN) are the first cells to be recruited to the site of infection. PMN are important to control fungi, protozoan and bacterial infections, through oxidants and protease-dependent mechanisms (LEE, 2003; FAURSCHOSE, 2003). However, PMN have a short life-span and are constitutively programmed to enter apoptosis, they are then removed by macrophages, accelerating the

inflammation resolution (SAVILL, 1995). Apoptotic cells that are not removed, progress to a secondary necrosis state (SAVILL, 1995). The phagocytosis of lysed PMN induces macrophage activation with TNF- α production and neutrophilic elastase (NE) secretion (FADOK, 2001).

On the other hand, the clearance of apoptotic cells by macrophage releases anti-inflammatory mediators like TGF- β 1, PGE₂ and PAF that block macrophage activation (FADOK, 1998). This suppressive environment modulated by the uptake of apoptotic cells leads to an increase in pathogen replication in the host cell such as *Coxiella burnetti* (ZAMBONI, 2003), HIV-1 (LIMA, 2002) and protozoa parasites such as *Trypanozoma cruzi* (Freire-Lima, 2000) and *Leishmania major* (RIBEIRO-GOMES, 2004). The phagocytosis of apoptotic lymphocytes by *T. cruzi* - infected BALB/c macrophages increases the parasite burden through the production of TGF- β , prostaglandin, nitric oxide and polyamine (FREIRE-LIMA, 2000). However, the uptake of apoptotic inflammatory PMNs drives the host response in *L. major* infected-BALB/c and C57BL/6 mice is associated with susceptibility or resistance to infection, respectively. Moreover, the leishmanicidal activity induced by PMNs in C57BL/6 mice is dependent on neutrophilic elastase, reactive oxygen species and TNF- α production (RIBEIRO-GOMES, 2004).

In the present study, we investigated the effect of apoptotic and necrotic human PMN phagocytosis by macrophages during infection with *Leishmania amazonensis*. We observed that apoptotic, but not viable PMN can increase parasite burden in a TGF- β and prostaglandin dependent mechanism. On the other hand, phagocytosis of necrotic PMN by *L. Amazonensis* - infected macrophages increases its infection rate as well as its parasite burden.. The inhibition of parasite replication by phagocytosis of necrotic cells is mediated by TNF- α and neutrophilic elastase secretion. These findings could help the understanding the mechanisms regulating innate immunity during the human infection by *Leishmania*.

Materials and Methods

Cell culture: Human blood was obtained from healthy volunteers from Hemocentro do Estado da Bahia, BA, Brasil. Human neutrophils were isolated by centrifugation in PMN medium according to the manufacturer's instructions (Robbins Scientific). Briefly, the blood preparation was centrifuged for 30 min at 300 X g at room temperature. PMNs were collected and washed three times at room temperature at 200 X g. PBMC were isolated by passage over Ficoll-Hypaque gradients (Sigma-Aldrich). The blood preparation was centrifuged for 30 min at 300 X g at room temperature. PBMC were washed three times, resuspended at concentration of 5 X 10⁶ cell per ml in RPMI- 1640 medium (Invitrogen), plated in 24- well tissue culture plate (Corning Incorporation) and incubated at 37° C, 5% CO₂ for 30 minutes. Non adherent cells were removed, and adherent cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyaclone) , 2 mM/ml L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (all from Invitrogen) for 7 days.

Leishmania culture and macrophage Infection: *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/87/BA125) promastigotes were cultured at 27 °C in DMEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% SBF, 2 mM/ml L

glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all from Invitrogen). Macrophages were cultured in glass coverslips and were infected with *Leishmania amazonensis*, at a ratio of 2:1 parasite to cell, for 4 hours. Wells were then washed to remove extracellular parasites.

Obtention of apoptotic and necrotic PMN: PMN apoptosis was induced by ultraviolet irradiation (245nm) for 10 min. Cells were then cultured in RPMI 1640 medium at 37°C, 5%CO₂ for 2 hours and used. With this method we obtained 70-80% of apoptotic cells (assessed morphologically by light microscopy of stained cytocentrifugated samples). To induce necrosis, PMN were submitted to 10 cycles of freeze and thaw. Necrosis was assessed by light microscopy. Viable PMN were reserved to experimental control. All conditions were used at ratio of 3:1, PMN to macrophage. The Jurkat cell were used to control of experiments. This cells were submitted to similar conditions than neutrophils to induce apoptosis and necrosis.

Co-culture of infected macrophage with viable, apoptotic and necrotic neutrophils: Infected macrophages were co-incubated with viable, apoptotic or necrotic neutrophils in RPMI medium supplemented with 1% Nutridoma-SP (Roche), 2mM/ml L- glutamine, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100µg/ml (all from Invitrogen). Macrophages were cultured in glass coverslips and were harvested after 3 days, fixed with ethanol and stained with Hematoxilin-Eosin (HE). Macrophage infection was determined by optical microscopy. In some experiments, infected macrophages were co-cultured with apoptotic or necrotic neutrophils in the presence of neutralizing antibody: 6 µg/ml of anti human-TGFβ₁ (R&D Systems), 6 µg/ml of anti human-TNFα (R&D Systems) or purified mouse IgG1 isotype control (BD-Pharmingen). In some cultures, 50 µg/ml of anti-human neutrophil elastase (Calbiochem) was added or anti-IgG rabbit control (50 µg/ml) (R&D Systems), 50µg/ml of antipain (Sigma-Aldrich) or 1 µM/ml of Indomethacin (Sigma-Aldrich).

Mechanism of parasite killing: We tested for presence of the reactive oxygen intermediates in co-cultures of infected macrophages and necrotic neutrophils. Nitric oxide production in the culture supernatant was evaluated by Griess method, as described. To identify the reactive oxygen intermediates presence, was added to 1000U/mL of catalase (Sigma) in the co-cultures of macrophages and neutrophils. After 72 hours, covers slips were stained with HE and macrophage infection was determined by optical microscopy.

Statistical analysis: Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 3.0 (Graphpad Software, CA) using nonparametric Wilcoxon test. Differences were considered significant when $p < 0, 05$.

Results

- Interaction with apoptotic or necrotic neutrophils leads to differences in human macrophage infection by *Leishmania amazonensis*.

We cultured viable, apoptotic or necrotic neutrophils with *Leishmania amazonensis*- infected macrophages. As shown in Fig A, the interaction of infected macrophages with apoptotic neutrophils significantly exacerbated macrophage infection, while it did not have difference in the infection of macrophage in viable PMN presence. However, the interaction with necrotic neutrophils decreased infection. Similar results were obtained when we analyzed parasite burden (Fig 1B). We observed an significant increase in the number of parasites per 100

macrophages in the co-culture with apoptotic neutrophils and a decrease in the co-culture with necrotic neutrophils. To verify if this effect was dependent on specific interaction between macrophages and neutrophils, we repeated these experiments with viable, apoptotic and necrotic Jurkat cells. We observed that the presence of apoptotic or necrotic Jurkat cells increased both the macrophage infection rate and the parasite burden. (Figs 1 C and D).

- Role TGF- β and PGE₂ during apoptotic neutrophil and infected macrophages interaction.

Studies in the literature have demonstrated that the phagocytosis of apoptotic cells leads to the release of anti-inflammatory mediators, such as TGF- β and PGE₂, which inhibit macrophage activity. To verify whether the increase in infection, observed after apoptotic PMN phagocytosis by *L. amazonensis*-infected macrophages was dependent on TGF- β , we cultured apoptotic neutrophils and infected macrophage with anti human- TGF- β antibody. As show in Fig.2, the addition of the neutralizing antibody decreased the infection (Fig 2A) as well as parasite replication (Fig 2B). We also evaluated the role of PGE₂ in this phenomenon. We added Indomethacin, a cyclooxygenase inhibitor, to the co-culture of apoptotic PMN and infected macrophages. We observed an inhibition in the infection rate (Fig. 3A) and in the number of parasites per infected cells (Fig. 3B).

- Role of TNF- α and Neutrophilic Elastase during necrotic neutrophils and infected macrophages interaction

Phagocytosis of lysed neutrophils stimulates TNF- α , IL-10 and MIP2 production by macrophages (FADOK, 2001). To verify whether TNF- α was involved in the decrease of macrophage infection, in the presence of necrotic neutrophil, we co-cultured macrophages and necrotic PMNs in the presence of anti human- TNF- α antibody. We observed an increase in the infection rate, showing the importance of TNF- α in the control of infection (Fig 4). Has been shown that neutrophilic elastase might be an inducer of TNF- α production by human macrophages exposed to lysed neutrophils. To test this hypothesis, we added anti human – elastase to the co-cultures of macrophage plus necrotic PMN. We observed that the addition of anti human –neutrophilic elastase led to a significant increase in the infection rate (Fig 5).

- Mechanism of killing parasites is dependent on ROI.

Some reports showed that NE and TNF- α are able to induce the production of reactive oxygen intermediates by macrophages (LIEW, 1990; TITUS, 1989). We observed that TNF α and NE addition induced a decrease in macrophage infection (Fig 4 e 5). To verify if this decrease was due to NO, we measured the nitric oxide production in the supernatants of the culture by Griess method (Fig 6A). We did not observe any differences in the nitric oxide production in the culture. This fact suggests that the killing of parasites is mediate by an NO-independent mechanism. To verify this hypotesis, we added catalase to the co-culture at the same time of necrotic PMN. After 72 hours, the cover slips were stained with HE and the infection ratio was determined. The catalase induced an increase in macrophage infection (Fig 6B), suggesting that intermediate oxygen species (ROI) is a responsible for parasite killing.

Discussion

Neutrophils are the first cells to arrive at the site of infection. A neutrophil infiltrate was observed 48-72 hours after *L major* or *L amazonensis* infection of mice (Pompeu, 1991; GRIMALDI, 1984). Some reports also show the presence of neutrophils in chronic infection by *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* (POMPEU, 1991; BEIL, 1992; MOURA, 2005). However, neutrophils have a short life-span and are constitutively programmed undergo cell death by apoptosis (SAVILL, 1995). They are then removed by activated neighboring macrophages (SAVILL, 1995). Apoptosis was defined originally as a programmed or physiological cell death that does not induce inflammation (SAVILL, 2002). Apoptotic cell removal might suppresses inflammation, modulating the invasion and replication of intracellular parasites as well as immune responses (SAVILL, 2000). The release of anti inflammatory mediators suppresses the production of pro inflammatory substances (LOPES, 2000). In this report, we have investigated the role os phagocytosis of human apoptotic or necrotic neutrophils by *Leishmania amazonensis* infected- macrophages.

Our results show an increase in macrophage infection by *Leishmania amazonensis*, in the presence of apoptotic neutrophils, in a mechanism dependent on TGF- β and PGE₂. Accordingly, phagocytosis of apoptotic cells in the inflammatory site suppresses the release of TNF- α (VOLL, 1997; FADOK, 1998) and induces the release of TGF- β ₁, PGE₂ and PAF by human macrophages (FADOK, 1998).

Suppression of pro-inflammatory cytokines release induced by the clearance of apoptotic cells might favor the infection by microorganisms. Phagocytosis of the apoptotic lymphocytes decreases the production of NO and increases the bacterial burden in mouse macrophages (ZAMBONI, 2003). In addition, the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by mouse macrophages increase *T cruzi* infection (FREIRE-DE LIMA 2000). This increase was induced by TGF- β and PGE₂ release and by the generation of polyamines (FREIRE-DE LIMA, 2000). Treatment with anti TGF- β in C57BL/6 mice led to a decrease in parasite burden and healing in a NO dependent- mechanism, without alteration in the pattern of IL-4 and IFN- γ production (LI, 1999). The presence of apoptotic neutrophils increases the replication of *L major* in BALB/c mice *in vivo* and this growth is dependent on the release of TGF- β and PGE₂ by macrophages (RIBEIRO-GOMES, 2004).

In contrast to apoptotic cells, the macrophage might become activated releasing pro inflammatory mediators when they ingest cells in secondary necrosis (SAVILL, 2000). Our results show that necrotic PMN induce a decrease in the infection human macrophage with *Leishmnaia amazonensis* in a mechanism dependent on TNF- α and neutrophilic elastase.

Phagocytosis of lysed neutrophils has the ability to stimulate MIP-2, IL-8, TNF- α and IL-10 production by human macrophages (FADOK, 2001). TNF- α is associated with the resistance against many pathogens. In vitro, TNF- α is involved in the induction of nitric oxide that contributes to microbicidal activity of macrophage against *L major* (LIEW, 1990) and *T cruzi* (SILVA, 1995). Many reports show the importance of TNF- α in the control of infection induced by *L major* (TITUS, 1989; WILHELM, 2001).

Neutrophilic elastase is implicated in tissue injury and inflammation mediated by neutrophils (LEE, 2001). Neutrophilic elastase is a major contributor to the induction of pro- inflammatory mediators as well as IL-

10 by macrophage (FADOK, 2001). It has been shown that neutrophilic elastase binds specifically to macrophage and increases chemokines production (ISHIHARA, 1999). The pancreatic elastase induces TNF- α production by macrophage in a NF κ B dependent-mechanism (JAFFRAY, 2000). Our results show that necrotic neutrophils present in co-culture induce a decrease in *L. amazonensis* infection in human macrophages. This effect was abolished when anti human neutrophilic elastase was added to the culture, suggesting the role of neutrophilic elastase in the resolution infection.

Neutrophilic elastase (SPEER, 1984) and TNF- α (LIEW, 1990) induce oxygen species production by macrophages. Therefore, we verified nitric oxide (NO) participation in the killing parasite. We did not observe any differences in NO production by human macrophage infected by *L. amazonensis* in the presence or absence of necrotic neutrophils, suggesting that the killing of parasite is mediated by mechanism dependent of ROI production. To test this hypothesis we added catalase, a H₂O₂ inhibitor, to the cultures of necrotic PMN plus *L. amazonensis* infected-macrophage. Our results showed that macrophage ratio infection increase in the presence of catalase, showing that reactive oxygen intermediates are involved in control of macrophage infection by *Leishmania amazonensis*, but not NO

Reports have shown the importance of NO in the control of *Leishmania* infection in mice. MURRAY (1999), showed that mice deficient in iNOS infected by *Leishmania donovani* were not able to control infection. However, NO production in humans infected with *Leishmania* is controversial. Some reports showed the participation of NO in response to intracellular pathogens such as *L. major*. (VOULDOUKIS, 1995) and *Mycobacterium tuberculosis* (NICHOLSON, 1996). HOWEVER et al., (2001) showed they NO production in murine macrophages but not in human macrophages.

EREL et al. (1999) observed that plasma NO levels and erythrocyte SOD activities were higher, and that catalase and GSH-Px (glutathione peroxidase) activities were lower in cutaneous leishmaniasis patients than in healthy subjects. SERERSLAN et al. (2005) shows that serum level of SOD and GSH-Px activities was significantly decrease in the CL patients. Significantly higher levels of serum NO were found in CL patients, compared to controls and treated patients.

RIBEIRO-GOMES et al. (2004), showed that decrease in parasite burden observed in C57BL/6 infected macrophage by *L. major* in the presence of apoptotic neutrophils is a NO-independent mechanism. However, under same experimental conditions, addition of catalase led an increase of infection, suggesting that the parasite control was dependent of ROI.

The understanding this early fase of *Leishmania amazonensis* infection, could contribute to development of new terapeuthical strategies against this disease, as well as vaccines approaches.

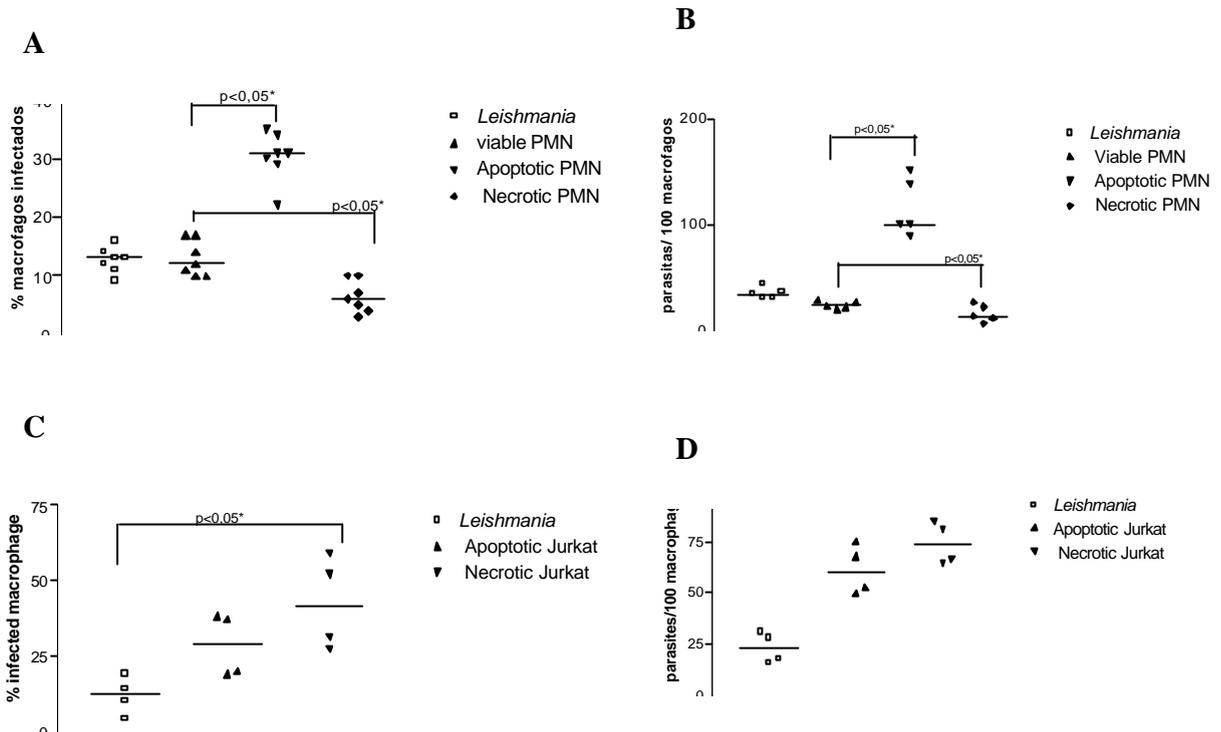


Figure 1: Effect of apoptotic or necrotic neutrophil phagocytosis by macrophage infected with *Leishmania amazonensis*. **A and B**- Specific effect of apoptotic or necrotic neutrophils phagocytosis by macrophage. Macrophages were infected with *Leishmania amazonensis* and cultured in medium alone (○) or with 3:1 viable PMN (●), 3:1 apoptotic PMN (◆) and 3:1 necrotic PMN (■). Experiments were repeat 6 times. **C and D** effect of apoptotic or necrotic Jurkat cells phagocytosis by macrophages. Macrophages were infected with *Leishmania amazonensis* and cultured in medium alone (○) or with 3:1 viable Jurkat (●), 3:1 apoptotic Jurkat (◆) and 3:1 necrotic Jurkat (■). Experiments were repeat 4 times. Monolayers were stained with HE and assessed for the percentage of infected macrophage and for the parasite burden.

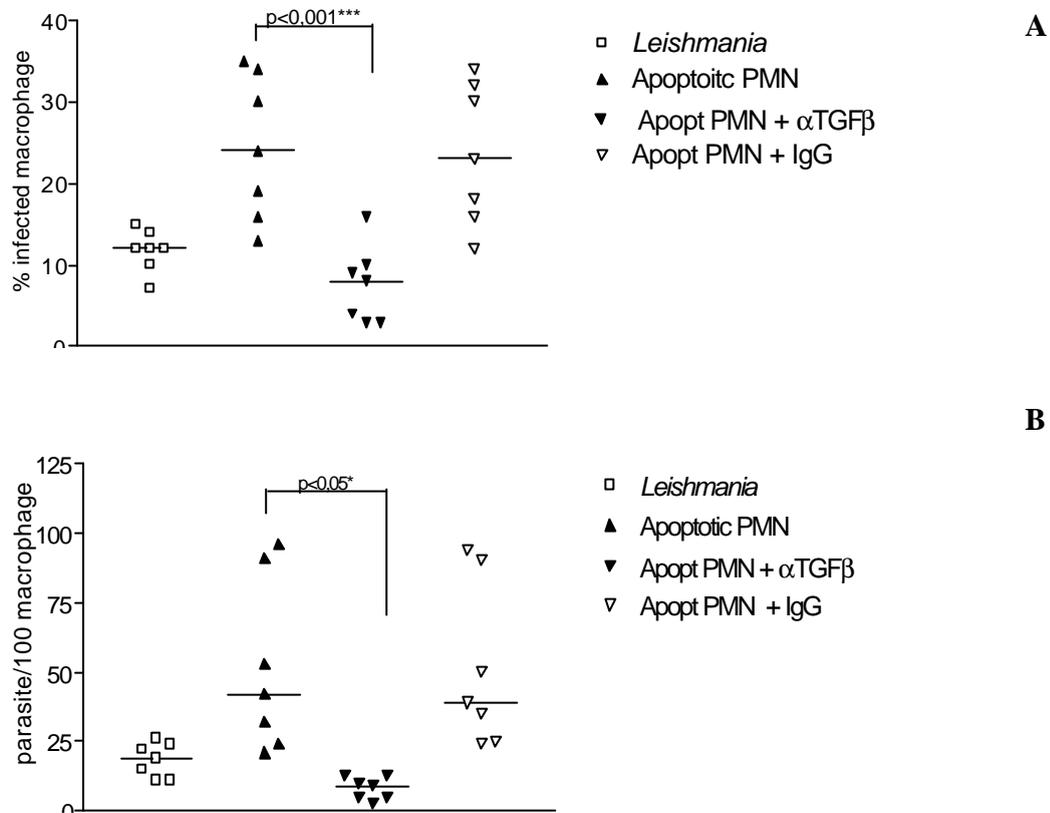


Figure 2: Effect of TGF β in co-cultures of macrophage and apoptotic PMN. Macrophages were infected with *Leishmania amazonensis* (2 parasite:1cell) for 4 hours. Infected macrophages were cultured in medium alone (□) or with 3:1 apoptotic neutrophils (▲), in the presence of anti-TGF β (▼) or IgG mouse control (▽). Monolayers were stained with HE and assessed for macrophage infection as well as for parasite number in 100 macrophages. Experiments were repeated 7 times.

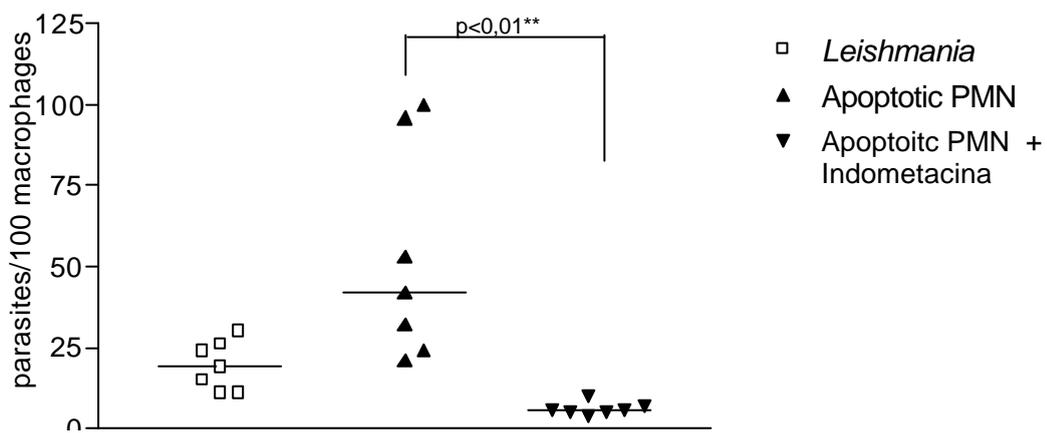
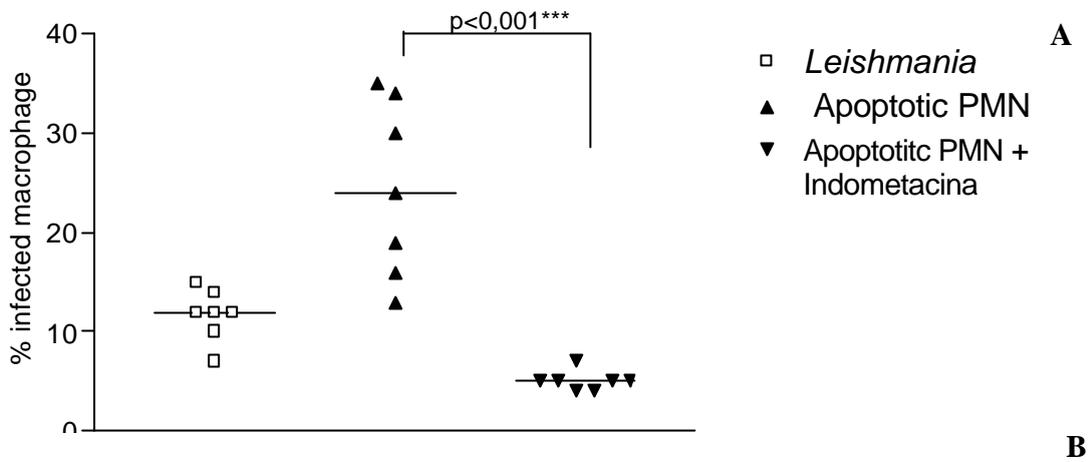


Figure 3: Effect of PGE₂ in co-cultures of infected macrophage and apoptotic PMN. Macrophages were infected with *Leishmania amazonensis* (2 parasite:1cell) for 4 hours. Infected macrophages were cultured with medium alone (□) or with 3:1 apoptotic neutrophils (▲) in the presence indomethacin (▼). Monolayers were stained with HE and assessed for macrophage infection as well as for parasite per macrophages. Experiments were repeated 7 times.

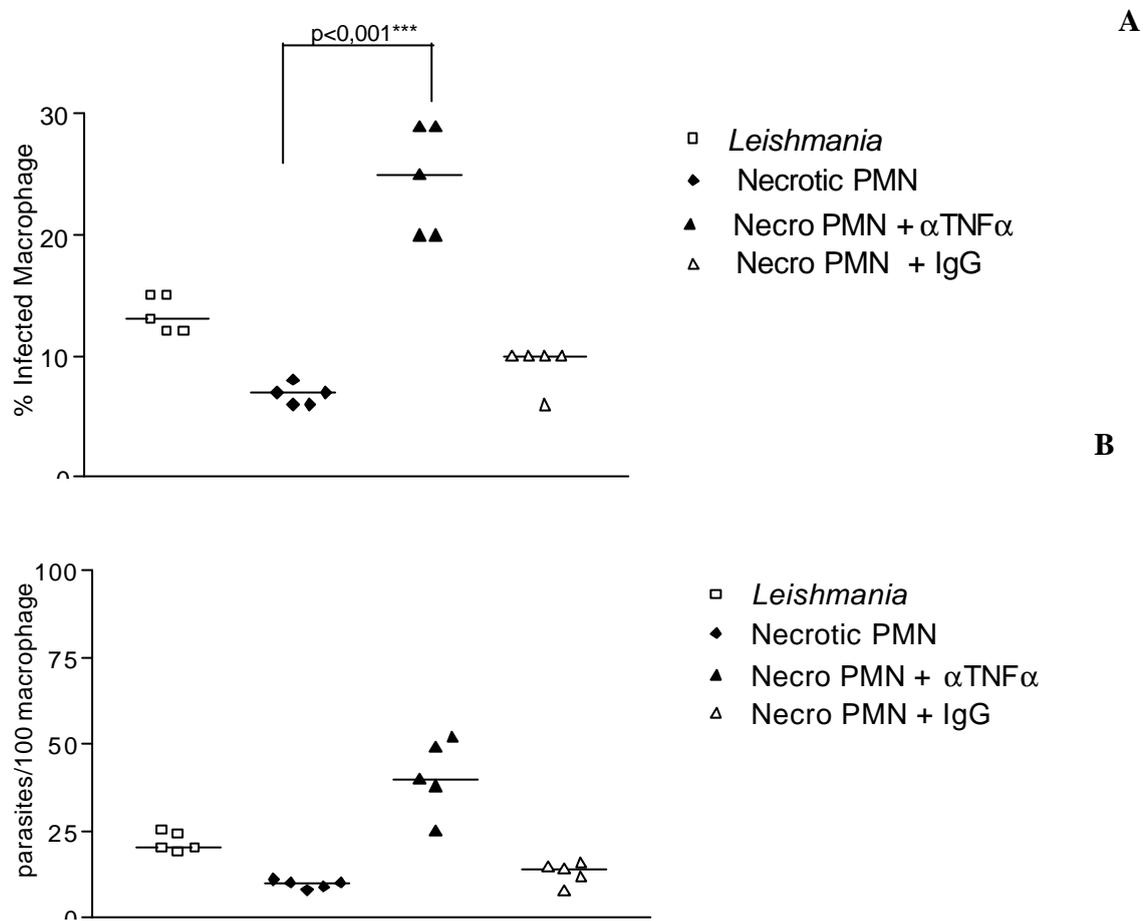


Figure 4: Effect of TNF- α in co-cultures of infected macrophage and necrotic PMN. Macrophages were infected with *Leishmania amazonensis* (2 parasite:1cell) for 4 hours. Infected macrophages were cultured with medium alone (\square) or with 3:1 necrotic neutrophil (\blacklozenge) in the presence of anti TNF α (\blacktriangle) or IgG mouse control (\triangle). Monolayers were stained with HE and assessed for macrophage infection as well as for parasite number per 100 macrophages. Experiments were repeated 5 times.

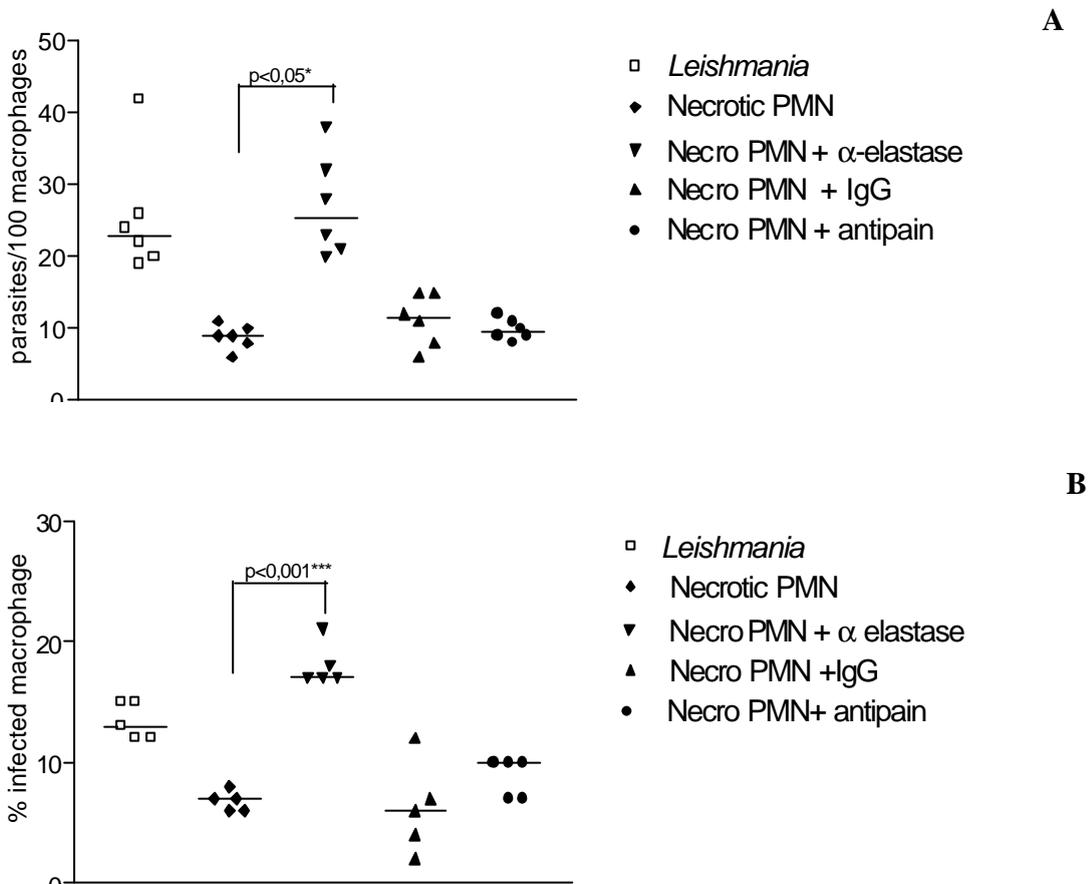


Figure 5: Effect of anti human-NE in co-cultures of infected macrophage and necrotic PMN. Macrophages were infected with *Leishmania amazonensis* (2 parasite:1cell) for 4 hours. Infected macrophages were cultured with medium alone (□) or with necrotic neutrophil (◆) in the presence of anti human NE (▼), IgG mouse control (▲) or antipain (●). Monolayers were stained with HE and assessed for macrophage infection as well as for parasite number per 100 macrophages. Experiments were repeated 5 times.

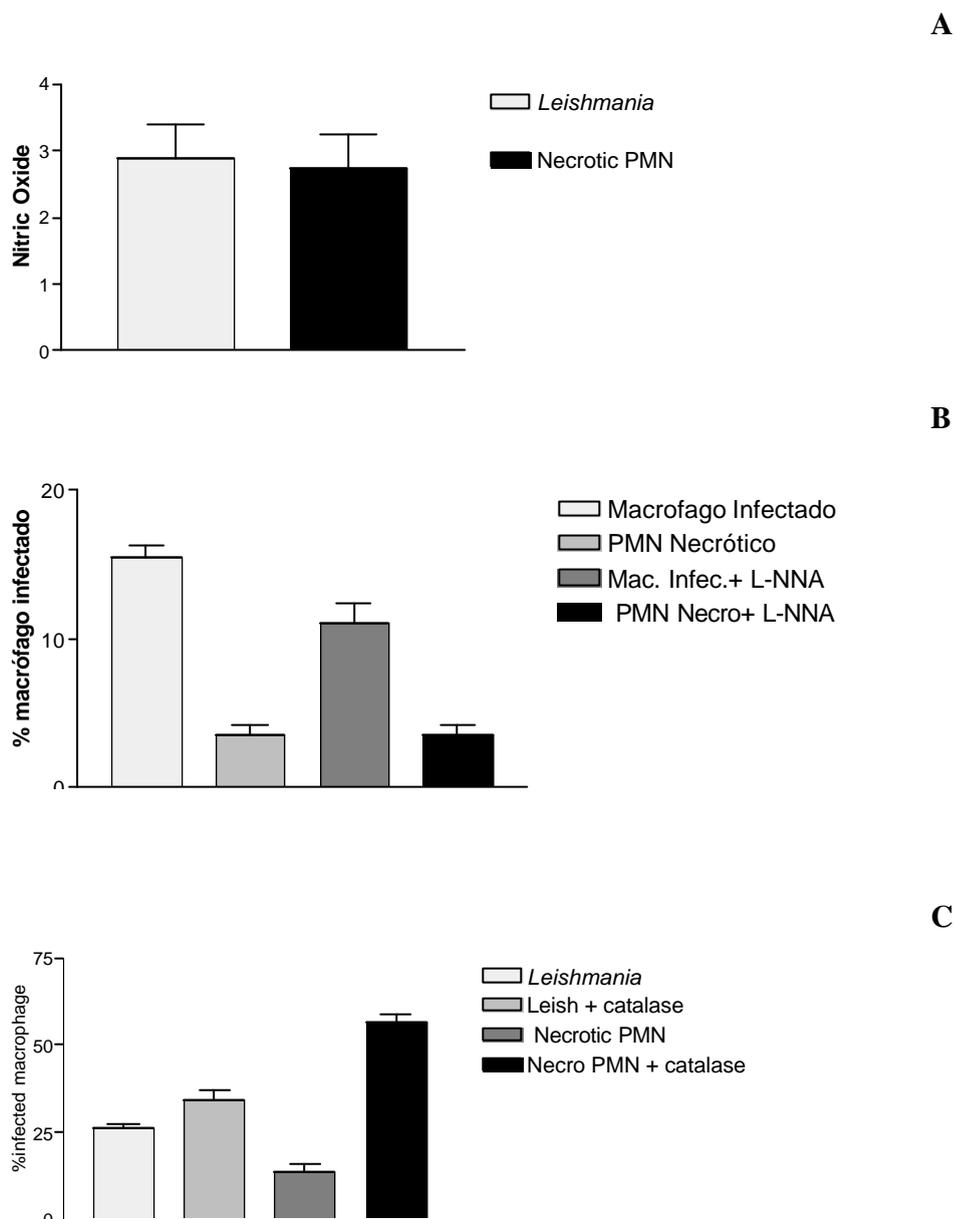


Figure 6: Mechanism of parasites killing is dependent on ROI. Macrophage were infected with *Leishmania amazonensis* for 4 hours. A- Detection of nitric oxide in co-cultured supernatant. B- Role of NO in parasite killing. Infected macrophage were cultured alone or in the presence of necrotic neutrophil with or without L-NNA C- Role of ROI in parasite killing. Infected macrophage were cultured alone or in the presence of necrotic neutrophil with or without catalase. B and C Monolayers were stained with HE and assessed for percentage of infected macrophage. Experiments were repeated 2 times.

REFERENCES

- 1- LEE, W.L.; HARISSON, R.E.; GRISTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes Infect.**, **5**:1299-1306, 2003.
- 2- FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.**, **5**:1317-1327, 2003.
- 3- SAVILL, J.; HASLETT, C. Granulocytes clearance by apoptosis in the resolution of apoptosis. **Semin. Cell Biol.**, **6**: 385-393, 1995.
- 4- FADOK, V.A.; BRANTON, D.L.; GUTHTIE, L.; HENSON, P.M. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines:Role of proteases. **J. Immunol.**, **166**: 6847-6854, 2001.
- 5- FADOK, V.A.; BRANTON, D.L.; FREED, P.W.; WESTCOTT, J.Y.; HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanism involving TGF- β , PGE₂ and PAF. **J. Clin. Investigat.**, **4**: 890-898, 1998.
- 6- ZAMBONI, D.S.; RABINOVICH, M. Phagocytosis of apoptotic cells increase the susceptibility of macrophages to infection with *Coxiella burnetii* phase II trough down-modulation of nitric oxide production. **Infect. Immun.**, **72**:2075-2080, 2004.
- 7- LIMA, R.G.; WEYENBERG, J.V.; SARAIVA, E.M.B.; BARRAL-NETTO, M.; GALVÃO-CASTRO, B.; BOU-HABIB, D.C. The replication of HIV type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. **J. Infect. Dis.**, **185**: 1561-1566, 2002.
- 8- FREIRE-DE-LIMA, C.; NASCIMENTO, D.O; SOARES, M.B.P.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.; MELLO, F.G.; DOS REIS, G.; LOPES, M.F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, **403**: 199-203, 2000.
- 9- RIBEIRO-GOMES, F.; OTERO, A C.; GOMES, N.A; MONIZ-DE-SOUZA, M.C.A; FINKELSTEIN, L.C.; ARNHOLDT, AC.; CALICH, V.L.; COUTINHO, S.G.; LOPES, M.F.; DOS REIS, G.A. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J. Immunol.** **172**: 4454-4462, 2004.
- 10- LIEW, F.Y.; LI, Y.; MILLOT, S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, **145**: 4305-4310, 1990.
- 11- TITUS, R.G.; SHERRY, B.,; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis.. **J. Exp. Med.**, **170**: 2097, 1989.

- 12- GRIMALDI, C. Jr.; SOARES, R.J.; MORIEARTY, P.L. Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, **6**:397-408, 1984.
- 13- POMPEU, M.L.; FREITAS, L.A; SANTOS, M.L.V.; KHOURY, M.; BARRAL-NETTO, M. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta Trop.**, **48**:185-193, 1991.
- 14- BEIL, W.J.; MEINARDUS-HAGER, G.; NEUGEBAUER, D.; SORG, C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous Leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **J. Leuc. Biol.**, **52**: 135-142, 1992.
- 15- DE MOURA, T.; NOVAIS, F.O; OLIVEIRA, F.; CLARENCIO, J.; NORONHA, A; BARRAL, A; BRODSKY, C.; DE OLIVEIRA, C.I. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, **73**:5827-34, 2005.
- 16- SAVILL, J.; DRANSKIEL, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat. Rev.**, **2**: 965-975, 2002.
- 17- SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nat.**, **407**:784-788, 2000.
- 18- LOPES, M.F.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; DOS REIS, G.A. The macrophage haunted by cell ghosts: a pathogen grows. **Immunol. Today**, **21**: 489-494, 2000.
- 19- VOLL, R.E.; HERMANN, M.; ROTH, E.A.; STACH, C.; KALDEN, J.R.; GIRKONTAITE, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. **Nat.**, **405**: 350-351, 1997.
- 20- LI, J.; HUNTER, C.A.; FARREL, J.P. Anti-TGF- β treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhanced in vivo nitric oxide production. **J. Immunol.**, **162**: 974-979, 1999.
- 21- WILHELM, P.; RITTER, U.; LABBOW, S.; DONHAUSER, N.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C.; KORNER, H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. **J. Immunol.**, **166**:4012, 2001.
- 22- LEE, W.L.; DOWNEY, G.P. Leukocyte elastase: physiological function and role in acute lung injury. **Am. Respir. Crit. Care Med**, **164**: 896, 2001.
- 23- ISHIHARA, K.; YAMAGUCHI, Y.; OKABI, K.; OGAWA, M. Neutrophil elastase enhanced macrophage production of chemokines in receptor-mediated reaction. Res. Commun. **Mol. Pathol. Pharmacol**, **103**:139, 1999.

- 24- JAFFRAY, C.; MENDEZ, C.; DENHAM, W.; CARTER, G.; NORMAN, J. Specific pancreatic enzymes activate macrophages to produce tumor necrosis factor- α : role of nuclear factor κ B proteins. **J. Gastrointest. Sur.**, **4**: 370, 2000.
- 25- SPEER, C.P.; PABST, M.J.; HEDEGAARD, H.B.; REST, R.F.; JOHNSTON, Jr, R.B. Enhanced release of oxygen metabolites by monocyte-derived macrophage exposed to proteolytic enzymes: activity of neutrophil elastase and cathepsin G. **J. Immunol.**, **133**: 2151, 1984.
- 26- MURRAY, H.W.; NATHAN, C.F. macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani* **J. Exp. Med.**, **189**: 741-746, 1999.
- 27- VOULDOUSKIS, L.; RIVEROS,-MORENO, V.; DUGAS, B.; OUAZZ, F.; BECHEREL, P.; DEBRE, P.; MONCADA, S.; MOSSALAYI, M.D. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc ϵ R2/CD23 surface antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**: 7804, 1995.
- 28- NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA, M.D.; LAPA E SILVA, J.R.; NATHAN, C.; XIE, Q.W.; MUNFORD, R.; WEIDNER, J.R.; CALAYCAY, J.; GENG, J.; BOECHAT, N. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J. Exp. Med.**, **183**: 2293, 1996.
- 29- GANTT, K.R.; GOLDMAN, T.L.; McCORMICK, M.L.; MILLER, M.A.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.T.; BRITIGAN, B.E.; WILSON, M.E. Oxidative response of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J. Immunol.**, **167**: 893-901, 2001.
- 30- EREL, O.; KOC, YIGCIT, A.; BULUT, V. Reactive nitrogen and oxygen intermediates in patients cutaneous leishmaniasis **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 179-83, 1999.
- 31- G. SERARSLAN, H. R.; YYLMAZ, S.; SOGUT, Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, **30**: 267-271, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)